



FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Molecular

**CARATERIZACIÓN ANTIGÉNICA E INMUNOGÉNICA
DE LA PROTEÍNA F DEL METANEUMOVIRUS HUMANO Y
COMPARACIÓN CON LA DEL VIRUS RESPIRATORIO
SINCITAL HUMANO**

LAURA RODRÍGUEZ GARCÍA



Madrid, Junio 2015

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Å	Amstrong
aa	Aminoácido
Ac	Anticuerpo
AcM	Anticuerpo monoclonal
CT	Cola citoplasmática
cRNA	RNA complementario
C-Terminal	Extremo carboxilo terminal
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
Fab	Fragmento de unión al antígeno
Fc	Proteína de fusión con la secuencia completa
F _{TM} -	Proteína de fusión que carece de la región transmembrana
GE	De sus siglas en inglés "gene-end"
GFP	De sus siglas en inglés "green fluorescent protein"
GS	De sus siglas en inglés "gene-start"
GST	Glutation S-transferasa
His	Histidinas
HN	Hemaglutinina
Ig	Inmunoglobulina
IMAC	Cromatografía de afinidad por iones metálicos
IMDM	Medio Iscove modificado por Dulbecco
ITR	Infecciones del tracto respiratorio
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
M	Molaridad
ME	Microscopio electrónico
MNVA	Metaneumovirus aviar
MNVH	Metaneumovirus humano
MNVH_A1	Metaneumovirus humano de la cepa NL/1/00 perteneciente al sublinaje A1

MNVH_B1	Metaneumovirus humano de la cepa NL/1/00 perteneciente al sublinaje B1
Mon	Monómero
mRNA	RNA mensajero
MWCO	Peso molecular corte, del inglés "Molecular weight cut-off"
NK	Del inglés "Natural Killer"
nm	Nanómetro
nt	Nucleótido
N-Terminal	Extremo amino terminal
OPD	O-fenilendiamina
ORF	Fase abierta de lectura
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
Pdb	Del inglés "protein data base"
pCAGGs_Fc_A1	Plásmido pCAGGs que contiene el gen de la proteína F del MNVH_A1
PF	Péptido fusión
pGEX-5x-3_RHA_L	Plásmido pGEX-5x-3 que tiene insertado un fragmento de la secuencia correspondiente con la RHA de la proteína F del MNVH_A1 seguido de un "linker"
pGEX-5x-3_RHA	Plásmido pGEX-5x-3 que tiene insertado un fragmento de la secuencia correspondiente con la RHB de la proteína F del MNVH_A1
pGEX-5x-3_RHA_L_RHB	Plásmido pGEX-5x-3 que tiene insertado un fragmento de la secuencia correspondiente con la RHA y de la RHB de la proteína F del MNVH_A1 unidos por un "linker"
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pRB21_Fc_A1	Plásmido pRB21 que contiene el gen de la proteína F del MNVH_A1
pRB21_F _{TM} -6His	Plásmido pRB21 que contiene el gen de la proteína F del MNVH_B1 al que se le eliminó la región transmembrana y se le añadió una cola de 6 histidinas
pRB21_F _{TM} -foldon_B1	Plásmido pRB21 que contiene el gen de la proteína F del MNVH_B1 con las mismas modificaciones que el pRB21_F _{TM} -6His al que se le ha insertado en el extremo C-Terminal la secuencia de reconocimiento del enzima TEV, la secuencia

codificante del motivo foldon y la secuencia de reconocimiento del Factor Xa antes de las 6 histidinas

pRB21_F _{TM} - Δ 103-111_KKRKRR_B1	Plásmido pRB21 que contiene el gen de la proteína F del MNVH_B1 con las mismas modificaciones que el pRB21_F _{TM} -_foldon_B1 al que se le han deletado los aminoácidos 103-111 y se le ha sustituido su sitio de procesamiento proteolítico por el sitio II del VRSH
pRB21_F _{TM} - Δ 103-111_KKRKRR_A1	Plásmido pRB21 que contiene el gen de la proteína F del MNVH_A1 con las mismas modificaciones a las descritas para el pRB21_F _{TM} - Δ 103-111_KKRKRR_B1
PS	Péptido señal
RNA	Ácido ribonucleico
RG	RespiGam
RG/ Δ F _{TM}	Anticuerpos del RG deplecionados de anticuerpos α -F _{TM}
RG/ α -F _{TM}	Anticuerpos del RG dirigidos frente a la proteína F _{TM}
RG/ Δ monómero	Anticuerpos del RG deplecionados de anticuerpos α -monómero
RG/ α -monómero	Anticuerpos del RG dirigidos frente al monómero de proteína F
RHA	Región heptádica A
RHB	Región heptádica B
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Enzima retrotranscriptasa
SAB	Seroalbúmina bovina
SC	Suero de cerdo
SDS	Dodecil sulfato sódico
STF	Suero de ternera fetal
TEV	Enzima; de sus siglas en inglés "Tobacco Etch Virud"
TM	Región transmembrana
Tris	Tris (hidroximetil)-aminoetano
U	Unidades de enzima
uff	Unidades formadoras de foco
ufp	Unidades formadoras de placa
UTR	Región no traducible
vv	Virus vaccinia
vRNA	RNA viral
VRSH	Virus respiratorio sincitial humano

vv_Fc (MNVH o VRSH)	Virus vaccinia recombinante que expresa la proteína F completa del MNVH o del VRSH
vv_F _{TM} ⁻ _VRSH	Virus vaccinia recombinante que expresa un mutante de la proteína F que carece de la región transmembrana del VRSH
vv_F _{TM} ⁻ _B1	Virus vaccinia recombinante que expresa la proteína F _{TM} ⁻ del MNVH_B1
vv_F _{TM} ⁻ _6His_B1	Virus vaccinia recombinante que expresa la proteína F _{TM} ⁻ con una cola de 6 histidinas en el extremo C-Terminal del MNVH_B1
vv_F _{TM} ⁻ _foldon_B1	Virus vaccinia recombinante que expresa la proteína F _{TM} ⁻ del MNVH_B1 al que se le ha insertado en el extremo C-terminal la secuencia de reconocimiento del enzima TEV, la secuencia codificante del motivo foldon, la secuencia de reconocimiento del Factor Xa y una cola de 6 histidinas.
vv_F _{TM} ⁻ _Δ103-111_KKRKRR_B1	Virus vaccinia recombinante que expresa la proteína F _{TM} ⁻ del MNVH_B1 que además de las modificaciones introducidas en el vv_F _{TM} ⁻ _foldon_B1 se le han delecionado los aminoácidos 103-111 y se le ha sustituido su sitio de procesamiento proteolítico por el sitio II del VRSH
vv_F _{TM} ⁻ _Δ103-111_KKRKRR_A1	Virus vaccinia recombinante que expresa la proteína F _{TM} ⁻ del MNVH_A1 con las mismas modificaciones explicadas para el vv_F _{TM} ⁻ _Δ103-111_KKRKRR_B1
6HB	De sus siglas en inglés “six hélix bundle”
α-6HB	Anticuerpos dirigidos frente al dominio 6HB
α-vv_Fc	Anticuerpos del suero de conejo inmunizado con vv_Fc
α-vv_Fc/ΔF _{TM} ⁻	Anticuerpos α-vv_Fc deplecionados de anticuerpos α-F _{TM} ⁻
α-vv_Fc/α-F _{TM} ⁻	Anticuerpos del suero α-vv_Fc dirigidos frente a la proteína F _{TM} ⁻
α-vv_Fc/Δmonómero	Anticuerpos α-vv_Fc deplecionados de anticuerpos α-monómero
α-vv_Fc/α-monómero	Anticuerpos del suero α-vv_Fc dirigidos frente al monómero de proteína F
α-vv_F _{TM} ⁻	Anticuerpos del suero de conejo inmunizado con vv_F _{TM} ⁻
α-vv_F _{TM} ⁻ /ΔF _{TM} ⁻	Anticuerpos α-vv_F _{TM} ⁻ deplecionados de anticuerpos α-F _{TM} ⁻
α-vv_F _{TM} ⁻ /α-F _{TM} ⁻	Anticuerpos α-vv_F _{TM} ⁻ dirigidos frente a la proteína F _{TM} ⁻

ÍNDICE

ÍNDICE

I. RESUMEN EN INGLÉS	1
II. INTRODUCCIÓN	3
1. Clasificación del Metaneumovirus humano (MNVH).....	3
2. Epidemiología, aspectos clínicos y diagnóstico de la enfermedad.....	4
3. Biología Molecular del MNVH.....	5
3.1. Genoma viral.....	5
3.2. Estructura del virión	7
3.3. El ciclo replicativo	8
3.4. Variabilidad genética y antigénica del MNVH.....	9
3.5. Proteínas Virales.....	10
4. La glicoproteína F del MNVH	13
5. Proceso de fusión de membranas promovido por la proteína F del MNVH y de otros paramixovirus.....	16
6. Respuesta inmune frente al MNVH	22
6.1. Respuesta humoral.....	22
6.2. Respuesta celular	25
7. Tratamiento y prevención.....	26
III. OBJETIVOS	29
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1. Material biológico	31
1.1. Líneas celulares.....	31
1.2. Virus.....	31
1.3. Bacterias	31
1.4. Animales	32
1.5. Anticuerpos	32
1.6. Plásmidos	32
1.7. Oligonucleótidos	33
1.8. Enzimas	34
2 Medios de cultivo	34
2.1. Células eucariotas	34
2.2. Bacterias	35
3. Otros reactivos de laboratorio	35
4. Manipulación de células y virus.....	36
4.1. Cultivo de células eucariotas	36
4.2. Cultivo de bacterias	36

4.3. Metaneumovirus humano_GFP (MNVH_gfp_A1 y MNVH_gfp_B1)	36
4.4. Virus Respiratorio Sincitial humano (VRSH)	37
4.5. Virus Vaccinia	38
5. Obtención de sueros policlonales	39
5.1. Sueros policlonales frente a los virus vaccinia recombinantes vv_Fc y vv_F _{TM} ⁻	39
5.2. Sueros policlonales dirigidos frente a GST-RHA-L-RHB.....	39
6. Subclonaje del gen que codifica la proteína F del MNVH de la cepa NL/1/00 (sublinaje A1) en el plásmido pRB21	40
7. Mutagénesis del gen de la proteína F del MNVH (cepas NL/1/00 y NL/1/99) clonado en el plásmido pRB21	41
8. Clonaje, expresión y purificación de fragmentos de proteína F fusionados a GST	43
9. Purificación y manipulación de anticuerpos	45
9.1. Purificación de anticuerpos policlonales mediante cromatografía de afinidad.....	45
9.2. Preparación de columnas de inmunoafinidad	46
9.3. Purificación de anticuerpos que reconocen a proteína F _{TM} ⁻ Δ 103-111_KKRKRR_B1 y al monómero de proteína F	46
10. Expresión y purificación de las proteínas F mutantes con cola de histidinas a partir de virus vaccinia recombinantes	47
Cromatografía de afinidad por iones (IMAC)	47
Cromatografía de filtración en gel.....	47
11. Métodos utilizados para el análisis de las proteínas	48
11.1. ELISA directo	48
11.2. ELISA indirecto	48
11.3. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección de proteínas (Western Blot).....	49
11.4. Detección del estado oligomérico de las proteínas mediante entrecruzamiento con glutaraldehído	49
11.5. Microscopía electrónica	50
11.6. Tratamiento de la proteína F _{TM} ⁻ _foldon_B1 con Tripsina-Agarosa	50
V. RESULTADOS	51
1. Generación de anticuerpos dirigidos frente a las seis α -hélices de la proteína F del MNVH	51
2. Expresión y purificación de formas solubles de la proteína F del MNVH	54
2.1. Optimización del rendimiento en la producción de proteína F trimérica soluble de la cepa NL/1/99 (sublinaje B1) en la conformación post-fusión	57
2.2. Obtención de un virus vaccinia recombinante que expresa una forma soluble de la proteína F de la cepa NL/1/00 (sublinaje A1) en la conformación post-fusión	64
3. Obtención de sueros policlonales dirigidos frente a distintas construcciones de la proteína F del MNVH de la cepa NL/1/99 (sublinaje B1)	66
4. Estudio comparativo de los anticuerpos inducidos en conejos por las distintas construcciones de la proteína F del MNVH y la proteína F del VRSH	67

5. Estudio comparativo de los anticuerpos de los anticuerpos neutralizantes dirigidos frente a las proteínas F del MNVH y del VRSH presentes en una preparación de inmunoglobulinas humanas	75
6. Neutralizaciones cruzadas del MNVH y del VRSH con anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos frente a las proteínas F del MNVH y del VRSH.....	79
VI. DISCUSIÓN.....	83
1. Obtención de anticuerpos específicos de la forma post-fusión de la proteína F del MNVH	83
2. Optimización de la producción del ectodominio soluble de la proteína F del MNVH en su conformación post-fusión	83
3. Comparación de los anticuerpos neutralizantes dirigidos frente a formas solubles y completas de las proteínas F del MNVH y del VRSH expresadas a partir de virus vaccinia recombinantes.....	85
4. Comparación de anticuerpos dirigidos frente a las proteínas F del MNVH y del VRSH presentes en una preparación de inmunoglobulinas humanas	87
5. Cros-reactividad y cros-neutralización entre anticuerpos dirigidos frente a las proteínas F del MNVH y del VRSH	88
6. Comparación de las estructuras antigénicas de las proteínas F del VRSH y del MNVH....	89
VII. CONCLUSIONES	93
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	95

I. RESUMEN EN INGLÉS

I. RESUMEN EN INGLÉS

Human metapneumovirus (hMPV) and human respiratory syncytial virus (hRSV) are the main etiological agents of acute lower respiratory tract infections in infants and very young children (ARI). ARI is an important cause of childhood morbidity and mortality worldwide. hMPV and hRSV are members of the *Pneumovirinae* subfamily within the *Paramyxoviridae* family. They are enveloped, non-segmented viruses, with negative-sense single stranded RNA genomes. hRSV is the best characterized virus of this group. hMPV was first reported in 2001 as the infectious agent of so far etiologically uncharacterized respiratory samples. hMPV was found to be structurally similar to hRSV in genomic organization, viral structure, antigenicity and clinical symptoms. There are no licensed hRSV or hMPV vaccines currently available. Most present efforts to control these pathogens are focused on the prophylactic use of neutralizing antibodies against the fusion protein (F) and the development of efficacious vaccines. In humans, high titers of serum neutralizing antibodies against the F protein correlate with protection of adult volunteers against a hRSV challenge and lower incidence of severe hRSV infection in children.

The F protein promotes fusion of the virus and cell membranes during virus entry and also fusion of the membranes of infected cells with those of surrounding cells to form syncytia. During membrane fusion, the F protein transits from a metastable pre-fusion conformation to a highly stable post-fusion conformation. Previous studies in the laboratory found that antibodies specific of the pre-fusion form of the hRSV F protein (hRSV_F) accounted for most of the neutralizing activity found in human immunoglobulin (Ig) preparations. Similar antibodies could be induced in rabbits inoculated with recombinant vaccinia viruses expressing full-length forms of hRSV_F.

These findings preceded the isolation of human pre-fusion specific MAbs which exhibited the highest neutralizing activity so far reported. Further developments led to the design of soluble hRSV_F constructs stabilized in the pre-fusion conformation which induced higher titers of neutralizing antibodies in animal models than soluble post-fusion hRSV_F.

The main objective of this Thesis was to compare the antigenic and immunogenic properties of hMPV_F with those of hRSV_F. In order to characterize conformation-specific antibody responses to hMPV, a soluble form of the hMPV_F protein stabilized in the post-fusion conformation (hMPV_F_{TM}- Δ 103-111_KKRKRR_B1) was initially isolated. After depletion of antibodies that bound to hMPV_F_{TM}- Δ 103-111_KKRKRR_B1, those specific for the pre-fusion form of hMPV_F could be uncovered.

A vaccinia virus recombinant was used to express a soluble trimeric form of the hMPV_F ectodomain, stabilized in the post-fusion conformation by i) substitution of the natural

cleavage site for the second cleavage site of hRSV_F, ii) deletion of the first 9 amino acids of the fusion peptide and iii) addition of a fibrin trimerization domain at the C-terminus of the hMPV_F ectodomain.

Unlike it was observed previously with hRSV_F, no neutralizing activity could be detected after depletion of rabbit or human Ig preparations with hMPV_F_{TM}- Δ 103-111_KKRKRR_B1. This result indicated that the neutralizing antibodies raised against hMPV_F protein are conformation independent; i.e., the majority of these antibodies recognize epitopes shared by the pre-fusion and post-fusion conformations of hMPV_F and probably inhibited virus infectivity by binding to the pre-fusion conformation of the F protein and blocking its refolding.

Finally, screening of several MAbs specific for antigenic site IV of hRSV_F identified an antibody, 101F that was able to bind to hMPV_F and inhibited infectivity of hMPV. This finding substantiates other reports about cross-neutralization of hMNv and hRSV by a limited number of monoclonal antibodies. However, polyclonal antibody preparations obtained in rabbits inoculated with vaccinia virus recombinants expressing the full-length or anchorless forms of either hMPV_F or hRSV_F did not show assessable cross-neutralization, indicating that cross-neutralization of hMPV and hRSV by antibodies is very limited.

Collectively, the results reported here represent a major step forward in our understanding of the antigenic and immunogenic properties of hMNv_F, in comparison with the highly related F protein of hRSV.

II. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

1. Clasificación del Metaneumovirus humano (MNVH)

El Metaneumovirus Humano (MNVH) se aisló por primera vez en 2001 a partir de aspirados nasofaríngeos de niños con infecciones del tracto respiratorio (van den Hoogen et al., 2001). Se ha clasificado en el género *Metapneumovirus*, subfamilia *Pneumovirinae*, dentro de la familia *Paramixoviridae*.

Los virus de la familia *Paramixoviridae* se clasifican dentro del orden *Mononegavirales* cuyas características son: 1) su genoma es una única molécula de RNA de polaridad negativa que está asociada con la nucleoproteína viral formando una nucleocápsida helicoidal que le confiere resistencia a la digestión por RNasas y a la que está asociada la polimerasa viral, 2) el genoma se transcribe por la acción de la RNA polimerasa viral de manera secuencial dando lugar a moléculas de RNA mensajeros subgenómicos (mRNA), 3) el ciclo replicativo es citoplasmático, 4) la progenie viral posee una envuelta lipídica que procede de la membrana plasmática de la célula infectada en la que se insertan las glicoproteínas virales y 5) la entrada en la célula hospedadora se produce a través de la fusión de la membrana viral y celular.

Atendiendo a criterios morfológicos, la organización del genoma, la actividad biológica de las proteínas y la relación de secuencia entre las distintas proteínas la familia *Paramixoviridae* se ha dividido en las subfamilias *Paramixovirinae* y *Pneumovirinae* (Figura 1). La subfamilia *Paramixovirinae* agrupa siete géneros: *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Morbilivirus*, *Henipavirus*, *Aquaparamixovirus*, *Avulavirus* y *Ferlavirus*; los criterios biológicos en esta clasificación se basan en la cros-reactividad antigénica entre miembros de un mismo género, la presencia o ausencia de actividad neuraminidasa, el distinto número de polipéptidos codificados a partir del gen P y la presencia de un gen extra (SH) en algunos *Rubulavirus*. Por otro lado, la subfamilia *Pneumovirinae* comprende dos géneros: *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*. La clasificación de los dos géneros está basada principalmente en su constelación génica: los *Metapneumovirus* carecen de las proteínas no estructurales NS1 y NS2, y el orden de los genes difiere de los *Pneumovirus* (Lamb et al., 2013).

El género *Pneumovirus* incluye el virus respiratorio sincitial humano (VRSH), el virus respiratorio sincitial bobino, ovino y caprino (VRSB, VRSO, VRSC) y el virus de la neumonía de ratón (VNR). El género *Metapneumovirus* únicamente agrupaba a los metaneumovirus aviares (MNVA) hasta el descubrimiento del MNVH, por lo que el MNVH está relacionado estrechamente con los MNVA y de forma más distante con el VRSH (van den Hoogen et al., 2002).

FAMILIA	SUBFAMILIA	GÉNERO	VIRUS
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Sendai • Parainfluenza humana I y III • Parainfluenza bovina III
		<i>Rubulavirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus de las Paperas • Parainfluenza V • Parainfluenza humana II y IV • Virus Mapuera • Rubulavirus porcino
		<i>Morbillivirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus del Sarampión • Morbillivirus cetáceo • Virus del Moquillo canino • Peste bovina • Virus del Moquillo de las focas • Rinderpest
		<i>Hepinavirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Hendra • Virus Nipah
		<i>Avulavirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus de la enfermedad de Newcastle
		<i>Ferlavirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Fer-de-Lance
		<i>Aquaparamixovirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Paramixovirus del salmón Atlántico
	<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Respiratorio Sincitial humano • Virus Respiratorio Sincitial bovino, ovino y caprino • Virus de la Neumonía del ratón
		<i>Metapneumovirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Metaneumovirus humano • Metaneumovirus aviar

Figura 1. Clasificación de los virus de la familia *Paramyxoviridae*.

2. Epidemiología, aspectos clínicos y diagnóstico de la enfermedad

La infección por el MNVH se produce de manera estacional con brotes epidémicos que tienen su punto álgido en enero en el hemisferio norte y en julio en el hemisferio sur (Pilger et al., 2011, Choi et al., 2006). Los aislados del MNVH se clasifican en dos grupos antigénicos que corresponden con dos linajes evolutivos, A y B. Virus de ambos grupos pueden co-circular durante una epidemia siendo frecuentes las re-infecciones por MNVH de distinto linaje (Williams et al., 2005b).

El MNVH es uno de los principales agentes causante de infecciones agudas del tracto respiratorio en niños de corta edad (menores de 2 años), así como en individuos inmunocomprometidos y en ancianos. Estudios de seroprevalencia han demostrado que entre el 90-100% de niños a la edad de 10 años han sido infectados por el MNVH pudiendo producirse reinfecciones en la edad adulta (van den Hoogen et al., 2001). Es un virus que se transmite de persona a persona mediante aerosoles (Kahn ,2006) y cuyo período de incubación es de 3 a 5 días (Panda et al., 2014).

Las manifestaciones clínicas son indistinguibles a las producidas en una infección por el VRSH (aunque generalmente más leves) y van desde un resfriado común en adultos (tos, congestión nasal, dolor de garganta y a veces fiebre) hasta cuadros clínicos más graves como bronquiolitis, bronquitis y neumonías en pacientes de corta edad (Boivin et al., 2002). Hay estudios que sugieren que infecciones por el MNVH pueden llevar a procesos de exacerbación de asma en niños y adultos (Williams et al., 2005a), en otros estudios el MNVH se ha relacionado con otitis media (Williams et al., 2006), y por último, hay evidencias de que la infección por MNVH en niños podría ocasionar, en raras ocasiones, el desarrollo de encefalopatías (Arnold et al., 2009). Los factores que contribuyen a una infección grave por el MNVH incluyen la co-infección con otro tipo de agente, la prematuridad, así como la existencia de otras dolencias de base como problemas pulmonares o de corazón.

Para el diagnóstico de la infección viral existen anticuerpos monoclonales comerciales para la inmunodetección del MNVH mediante ensayos de fluorescencia o ELISA. La mayor sensibilidad en la detección del MNVH en muestras clínicas se obtiene mediante RT-PCR (Matsuzaki et al., 2010). Varios estudios han desarrollado y evaluado las técnicas de RT-PCR múltiples con el objetivo de tener un herramienta capaz de detectar un panel completo de virus respiratorios (Litwin et al., 2014, Bellau-Pujol et al., 2005).

3. Biología Molecular del MNVH

3.1. Genoma viral

El genoma del MNVH es una molécula de RNA monocatenario de polaridad negativa y de aproximadamente 13.4 Kb que codifica 9 proteínas virales (van den Hoogen et al., 2002, Biacchesi et al., 2003). El RNA antigenómico, intermediario en la replicación del RNA, es una copia complementaria de polaridad positiva del RNA genómico. Los RNAs genómico y antigenómico no poseen CAP ni están poliadenilados, y están estrechamente unidos a la proteína N para formar nucleocápsidas resistentes a RNasas.

El genoma del MNVH se transcribe en 8 RNA mensajeros (mRNAs) subgenómicos cada uno de ellos con un marco de lectura abierto (ORF) a excepción del mRNA del gen M2 que tiene dos ORFs y da lugar a las proteínas M2-1 o 22K y M2-2. Los mRNA tienen una estructura CAP en el extremo 5' y están poliadenilados en el extremo 3'; ambas modificaciones son llevadas a cabo por acción de la polimerasa viral (L). Cada gen comienza con una secuencia de 16 nucleótidos (nt) (GGGACAA_nTnnnAATG) denominada "gene-start" (GS) que está altamente conservada entre todos los genes excepto en los genes L y SH que es ligeramente diferente (van den Hoogen et al., 2002). Los primeros 10 nt de la secuencia GS son casi idénticos a los 10 primeros nt de la secuencia GS de los genes del VRSH

(GGGGCAAAT(A/T)) (Biacchesi et al., 2003). La función de las secuencias GS es determinar el inicio de la transcripción y la adición del CAP. Todos los genes terminan con una secuencia de 12-15 nt (AGTTAnnnAAAA) denominada “gene-end” (GE) que regula la terminación de la transcripción y la poliadenilación del mRNA. Las secuencias consenso de las regiones GE del MNVH y del VRSH son idénticas (Biacchesi et al., 2003).

Los 8 genes del MNVH están separados por regiones intergénicas de longitud variable que va de 2 a 190 nt y no tienen identidad de secuencia ni entre sí ni con otros virus relacionados como el VRSH (van den Hoogen et al., 2002, Biacchesi et al., 2003) (Figura 2).

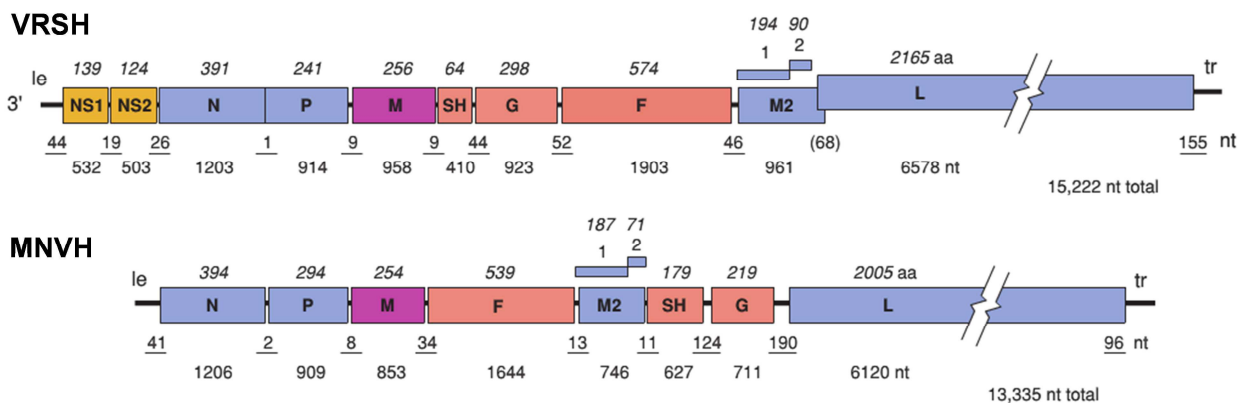


Figura 2. Esquema comparativo de los genomas del VRSH y del MNVH. Puede apreciarse que el MNVH carece de las proteínas no estructurales NS1 y NS2, que el orden de algunos genes es distinto al de los *Neumovirus* y que no hay solapamiento entre los genes M2 y L. Se indica la longitud en nucleótidos de las regiones intergénicas (números subrayados), así como el tamaño de cada gen y el del genoma completo. Le: región “Leader”. Tr: región “Trailer”. Imagen tomada del Fields Virology, capítulo 38.

En el extremo 3' del RNA genómico se localiza una región no codificante denominada “leader” (41 nt) que contiene el promotor para la transcripción del RNA y la síntesis del antígeno. En el extremo 5' del RNA genómico se localiza otra región no codificante denominada “trailer” (179 nt) que contiene la secuencia del promotor antígenico para la síntesis del genoma de la progenie viral. Los extremos 3' y 5' tienen una cierta complementariedad, lo que indica un alto grado de homología funcional entre las regiones “leader” del RNA genómico y antígenico (Mink et al., 1991). Ambas regiones presentan similitud de secuencia con el MNVA y el VRSH (Biacchesi et al., 2003).

En la Figura 2 se muestra un esquema comparativo del genoma del MNVH y del VRSH. Puede observarse que a pesar de que existen homologías en la organización génica, hay diferencias en el orden de los genes M2 y SH. Además, el MNVH carece de los genes que codifican para las proteínas no estructurales NS1 y NS2. Las otras diferencias más significativas entre ambos genomas son 1) el tamaño del genoma del MNVH es menor, 2) hay regiones intergénicas en el MNVH de mayor tamaño, 3) en el VRSH (y en el VRS bovino, ovino y

caprino) pero no en el MNVH hay un solapamiento de 68 nt entre los genes M2 y L, por lo que la secuencia GS del gen L del VRSH se localiza dentro del gen M2.

3.2. Estructura del virión

El análisis al microscopio electrónico (ME) de preparaciones del MNVH demuestran el carácter pleiomórfico del virus, observándose tanto partículas virales de forma esférica, con un diámetro entre 150-600 nm, y partículas filamentosas, todas ellas con espículas de 13-17 nm de longitud (van den Hoogen et al., 2001). Un esquema de la partícula viral se muestra en la Figura 3. La envuelta viral tiene insertadas tres glicoproteínas virales: la proteína de unión al receptor o proteína G, la proteína de fusión (F) que media la fusión entre la membrana celular y viral, y una proteína de pequeño tamaño e hidrofóbica, denominada SH. Rodeando la cara interna de la envuelta viral se encuentra la proteína matriz (M) y en el interior de la partícula está la nucleocápsida viral, compuesta por el RNA viral (vRNA) asociado a la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la polimerasa viral (L) y la proteína M2-1. El diámetro de la nucleocápsida es de unos 17nm, siendo esta una diferencia con el VRSH en el que la nucleocápsida es algo más estrecha (Peret et al., 2002).

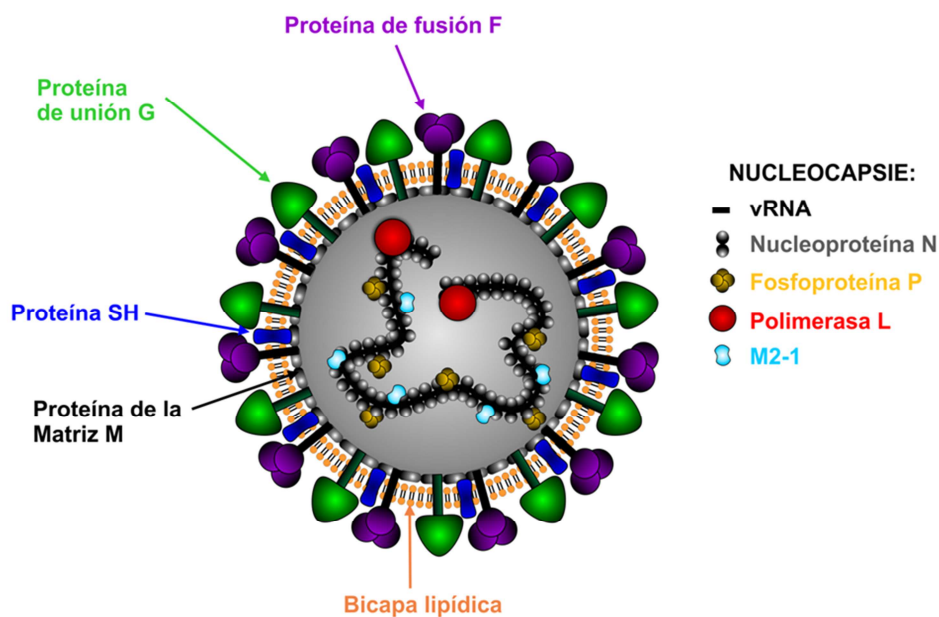
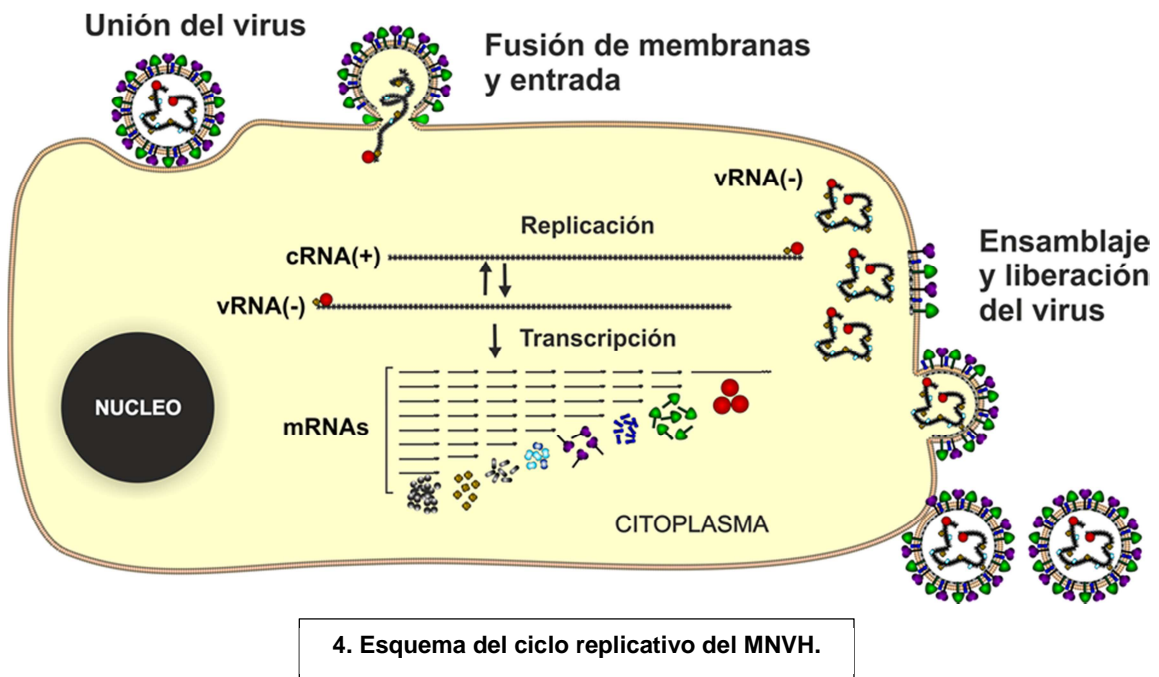


Figura 3. Representación esquemática de la partícula del MNVH. Se indica la localización de las proteínas estructurales que componen el virión.

3.3. El ciclo replicativo

Las etapas del ciclo infectivo del MNVH ,análogas a las del VRSH, (Collins et al., 2013) se muestran en la Figura 4. En primer lugar se produce la unión del virus a componentes de la superficie celular mediada principalmente por la proteína G. Esto conduce a la activación de la proteína de fusión (F) para llevar a cabo el proceso de fusión de las membranas viral y celular. La proteína matriz (M), que rodea la parte interna de la bicapa lipídica, se desestructura y la nucleocápsida se libera al citoplasma celular, iniciándose a continuación la transcripción y la replicación del RNA viral (vRNA) en el citoplasma celular. En el modelo de transcripción propuesto para todos los paramixovirus, esta se lleva a cabo de forma secuencial y polar desde un único promotor situado en la región "leader" (extremo 3') del vRNA. El complejo de la transcriptasa, formado al menos por las proteínas L, P y M2-1 (o 22k), inicia la transcripción del primer gen cuando encuentra la secuencia GS del mismo y la finaliza cuando encuentra la secuencia GE de terminación de la transcripción y poliadenilación. Seguidamente la transcriptasa atraviesa una región intergénica y reinicia la transcripción del siguiente gen cuando encuentra la siguiente secuencia GS. Este proceso de transcripción secuencial genera un gradiente polar en la abundancia de los mRNAs, puesto que cada vez que se interrumpe la transcripción al final de un gen hay una probabilidad de que esta no vuelva a iniciarse en el siguiente gen. Por ello, los mRNAs de los genes más cercanos al promotor son más abundantes. La longitud y secuencias variables de las regiones intergénicas contribuyen a modular la polaridad de la transcripción (Hardy et al., 1999, Kuo et al., 1996).



4. Esquema del ciclo replicativo del MNVH.

La replicación del genoma viral implica la síntesis de un intermediario replicativo llamado antígenoma (cRNA) que es una copia exacta del vRNA de polaridad positiva. Esta se produce cuando se ha acumulado una cantidad de proteína N suficiente para que a medida que, se va sintetizando el cRNA, este vaya siendo encapsidado por la proteína N libre. En estas condiciones, el complejo de la polimerasa ignora todas las regiones intergénicas y produce una copia exacta complementaria del vRNA. El vRNA progenie se sintetiza, a su vez, utilizando como molde el cRNA. La síntesis de ambos RNAs se inhibe cuando la proteína N es limitante.

El ensamblaje de las nuevas partículas virales ocurre en la parte interna de la membrana plasmática, orquestado en gran medida por la proteína M que interacciona con las nucleocápsidas recientemente formadas y con la cola citoplasmática de las glicoproteínas virales insertadas en la membrana plasmática. Finalmente, el virus sale de la célula infectada por gemación adquiriendo en este paso la envuelta lipídica que procede de la membrana celular y en la que están ancladas las glicoproteínas virales.

3.4. Variabilidad genética y antigénica del MNVH

Las primeras comparaciones de las secuencias obtenidas a partir de distintos aislados del MNVH pusieron de manifiesto la existencia de dos linajes genéticos: A y B (Peret et al., 2002, van den Hoogen et al., 2002, Biacchesi et al., 2003). El análisis de la secuencia del genoma completo de cepas de ambos linajes demostró una identidad de secuencia nucleotídica promedio del 80-81%, con un 92-93% de identidad entre cepas del mismo linaje (Biacchesi et al., 2003) observándose la mayor divergencia genética entre los dos linajes en los genes estructurales G > SH >> F. La proteína F tiene una identidad de secuencia aminoacídica del 94-97% entre los dos linajes y la proteína G de un 30-37%. Análisis filogenéticos posteriores realizados con parte de la secuencia de la proteína F (154-1506 nucleótidos) y con la secuencia completa de la proteína G demostraron que cada linaje podía ser dividido además en dos sublinajes: A1 y A2, B1 y B2 (van den Hoogen et al., 2004). Un estudio más reciente, en el que se incluyeron secuencias de los genes F y G de cepas recogidas entre 1981 y 2010 puso de manifiesto la división del sublinaje A2 en A2a y A2b (Papenburg et al., 2013), apoyando así la clasificación propuesta en otro estudio en el que se analizaron secuencias de los genes N y F (Huck et al., 2006) (Figura 5).

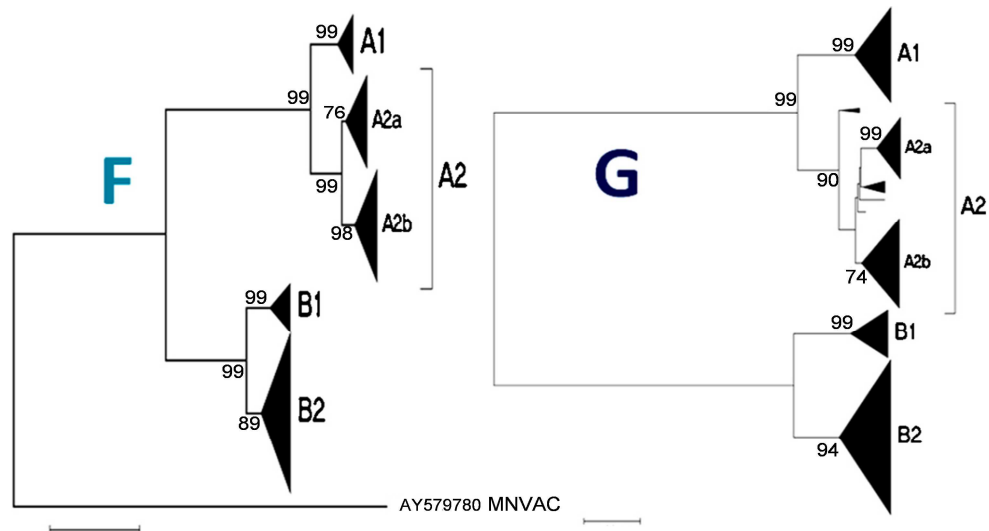


Figura 5. Árboles filogenéticos derivados de secuencias de las proteínas F y G del MNVH. Análisis realizado con secuencias de cepas aisladas durante los últimos 25 años. El análisis filogenético de las secuencias de ambos genes (F y G) dio lugar a 2 linajes A y B, divididos a su vez en dos sublinajes. En el análisis del gen F se incluyó la secuencia del gen de un metaneumovirus aviar (MNVAC). Los números indican valores de Bootstrap. Las barras de escala representan 0.05 sustituciones en pares de bases indicando la distancia genética horizontal. Tomada de Papenburg et al., 2013.

En cuanto a la variabilidad antigénica del MNVH, se ha observado que hay ciertas diferencias antigénicas entre virus de los dos linajes genéticos antes mencionados. Estas diferencias se observan por ejemplo con anticuerpos monoclonales (AcMs) neutralizantes que reconocen epítomos de la proteína F. Esto es de resaltar, puesto que la glicoproteína F es el único antígeno viral capaz de inducir anticuerpos neutralizantes y protectores en modelos animales (Skiadopoulos et al., 2004, Skiadopoulos et al., 2006, Herfst et al., 2008a, Biacchesi et al., 2004). Así mismo, se han detectado diferencias antigénicas entre virus de los dos linajes A y B del MNVH utilizando anticuerpos policlonales de animales inmunizados con virus atenuados o con vectores virales que expresaban la proteína F de ciertas cepas del MNVH o incluso con proteína F purificada (Buchholz et al., 2005, Cseke et al., 2007, Herfst et al., 2007, Herfst et al., 2008c, Tang et al., 2005a, Liu et al., 2013). En base a esos estudios, actualmente se considera que el MNVH tiene un único serotipo con dos grupos antigénicos (A y B) entre los que existe una elevada cros-neutralización así como una elevada cros-protección (Collins et al., 2013).

3.5. Proteínas Virales

Siguiendo el esquema de la Figura 3, a continuación se describen brevemente las propiedades más relevantes de las proteínas del MNVH.

Proteínas de la nucleocápsida viral:

Nucleoproteína (N): proteína de 394 aminoácidos con un tamaño similar a la proteína N del VRSH (391 aa) y menor que en el resto de paramixovirus (Biacchesi et al., 2003, van den Hoogen et al., 2002). La proteína N se une estrechamente al vRNA formando las ribonucleoproteínas (RNPs) virales que son el molde para la síntesis de RNA. Además, la proteína N se une también al cRNA confiriéndole protección (al igual que al vRNA) frente a las RNasas celulares.

Fosfoproteína (P): proteína de 294 aminoácidos que al igual que en el VRSH carece de residuos de cisteína. Existe una región de alta identidad de secuencia entre la proteína P de los *Pneumovirus* (aminoácidos 188-241) que también está presente en el MNVH y que podría jugar un papel importante en la síntesis del RNA (Ling et al., 1995). Esta región tiene una identidad de secuencia del 81% entre el MNVH y el VRSH. La proteína P es un cofactor esencial de la RNA polimerasa de los paramixovirus con dos funciones principales: 1) la interacción con la proteína N recién sintetizada para prevenir su agregación o la unión de esta a RNA no virales (Castagne et al., 2004) y 2) la interacción con moléculas de proteína N del complejo RNP facilitando la apertura del complejo, de manera que la polimerasa viral (unida a la P) pueda acceder a las bases del RNA (Dupuy et al., 1999).

Proteína 22K o M2-1: Proteína de 187 aminoácidos exclusiva de los *Pneumovirus* que se sintetiza a partir de la primera ORF del gen M2. Contiene 3 residuos de cisteína conservados en todos los *Pneumovirus* (van den Hoogen et al., 2002). En el caso del VRSH, la proteína M2-1 se co-localiza en la célula infectada con las proteínas N y P de los cuerpos de inclusión citoplasmáticos (García-Barreno et al., 1996) y funciona como un antiterminador de la transcripción, necesario para la síntesis de mRNAs de longitud completa (Collins et al., 1996). En el MNVH parece tener la misma función. Sin embargo, mientras que para el VRSH es una proteína esencial para la viabilidad del virus (Collins et al., 1995), MNVH recombinantes en los cuales la ORF de la proteína M2-1 está silenciada son viables para replicar “in vitro” con una eficiencia similar al virus “wild type”. Sin embargo, en un modelo animal (hámster) no se detectó replicación de estos virus por lo que la proteína M2-1 parece ser esencial para la replicación del MNVH “in vivo” (Buchholz et al., 2005).

Proteína M2-2: proteína de 77 aminoácidos que se sintetiza a partir de la segunda ORF del gen M2 (van den Hoogen et al., 2002). Es una proteína aparentemente no estructural pero se menciona aquí porque está implicada en la regulación de la transcripción y replicación del RNA viral, promoviendo la transición de la síntesis de RNA del modo de transcripción al de

replicación (Buchholz et al., 2005). MNVH recombinantes que tienen silenciada la expresión de la proteína M2-2 son virus atenuados “in vivo”.

Polimerasa (L): es la RNA polimerasa viral dependiente de RNA. Tiene 2005 aminoácidos y es el componente principal de los complejos de transcripción y replicación viral. Presenta una identidad global de secuencia baja con el resto de paramixovirus, pero tiene los cuatro motivos estructurales que están altamente conservados entre los mononegavirales (100% identidad de secuencia con los *Pneumovirus*) (van den Hoogen et al., 2002) y que posiblemente representan dominios funcionales de la proteína (Poch et al., 1989).

Proteínas asociadas a la membrana viral:

Proteína matriz (M): recubre la cara interna de la membrana del virus. Tiene un tamaño de 254 aminoácidos como el resto de metaneumovirus. En el VRSH coordina el ensamblaje de los componentes del virión en la membrana plasmática durante la morfogénesis del virus (Henderson et al., 2002, Teng et al., 1998) e inhibe la síntesis de RNA antes de su empaquetamiento en la partícula viral (Ghildyal et al., 2002). En el caso del MNVH se cree que tiene las mismas funciones.

Proteína SH: Es una proteína de membrana tipo II con una zona hidrofóbica central insertada en la membrana plasmática, quedando el extremo N-terminal orientado hacia el citoplasma celular y el extremo C-terminal hacia el exterior celular. Su tamaño varía entre los distintos aislados secuenciados (177-183 aminoácidos) (Biacchesi et al., 2003, van den Hoogen et al., 2002) y es tres veces mayor que el de la proteína SH del VRSH (64 aminoácidos) (van den Hoogen et al., 2002). Las diferencias en tamaño y secuencia aminoacídica entre los distintos aislados se localizan preferencialmente en el dominio extracelular. La función de esta proteína igual que en el caso del VRSH no está clara. Pases del MNVH en cultivos celulares llevan frecuentemente a la supresión de la expresión del gen SH sin que tenga efectos apreciables en la replicación del MNVH (Biacchesi et al., 2007). En hámsteres y monos verdes africanos, la replicación de virus recombinantes que carecen de la proteína SH es similar a la obtenida con el MNVH “wild-type” indicando que en estos sistemas la proteína SH es dispensable (Biacchesi et al., 2004, Biacchesi et al., 2005); sin embargo, todos los aislados clínicos tienen el gen de la proteína SH intacto indicando que la proteína SH juega un papel importante durante la infección en su huésped natural. Estudios recientes sugieren que la proteína SH puede pertenecer al grupo de las vioporinas ya que modifica la permeabilidad de la membrana de células transfectadas, y que además podría modular el proceso de fusión de membranas ya que este se ve drásticamente reducido en células co-transfectadas que

expresan las proteínas SH y F si se compara con células transfectadas que expresan solo la proteína F (Masante et al., 2014).

Proteína G: proteína de membrana tipo II con un tamaño de 219-236 aminoácidos (dependiendo de la cepa de virus) siendo menor que el de la proteína G del VRSH (289-299 aminoácidos). Al igual que en el VRSH, el ectodominio de la proteína G tiene un alto contenido en residuos de serina y treonina (potenciales aceptores de O-glicosilaciones), un alto contenido en residuos de prolina y varios sitios potenciales de N-glicosilación (van den Hoogen et al., 2002), lo que confiere a la proteína G un carácter singular con un alto contenido en cadenas laterales de oligosacáridos. La forma soluble de la proteína G (Gs) descrita para el VRSH no se ha encontrado en el caso del MNVH. Además, la secuencia aminoacídica de la proteína G del MNVH excluye la posibilidad de que se genera una forma soluble de la misma, al menos por el mismo mecanismo de iniciación interna de la transcripción como el descrito para la proteína Gs del VRSH (Biacchesi et al., 2003).

Como en el caso del VRSH, la proteína G se une a glicosaminoglicanos de la superficie celular (Thammawat et al., 2008), reflejando la función de esta proteína como responsable de las primeras interacciones del virus con la superficie de la célula.

Virus recombinantes a los que se les delecionó la proteína G (sola o en combinación con la proteína SH) son capaces de replicar "in vitro". Si bien, el virus que carece de la proteína G mostró un nivel de replicación atenuado respecto del virus "wild type" en hámsteres y monos verdes africanos, el virus fue capaz de replicar demostrando que la proteína G es dispensable en ensayos "in vitro" y en ensayos "in vivo" (Biacchesi et al., 2004, Biacchesi et al., 2005). La proteína G inhibe aparentemente la respuesta inmune innata ya que la infección de células epiteliales en cultivo con el MNVH que carece de la proteína G produce un aumento en la activación de los factores de transcripción IRF-3 y NF- κ B, reflejado en una mayor traslocación al núcleo y/o la fosforilación de los mismos y consecuentemente un aumento en la expresión de los genes de interferón tipo I y citoquinas proinflamatorias que en el caso del virus "wild type" (Bao et al., 2008).

Proteína F: puesto que el objeto de este trabajo ha sido el estudio de la proteína F del MNVH, a continuación se describen de forma más detallada las propiedades estructurales y funcionales de esta proteína.

4. La glicoproteína F del MNVH

La proteína F de los paramixovirus es una glicoproteína de membrana tipo I que media la fusión de la membrana viral y celular permitiendo la liberación de la nucleocápsida viral

al citoplasma celular. Además, en etapas posteriores del ciclo infeccioso, la proteína F presente en la membrana de las células infectadas promueve la fusión de la membrana de estas células con la de células adyacentes dando lugar a la formación de células gigantes multinucleadas denominadas sincitios (Walsh et al., 1983).

El gen que codifica la proteína F del MNVH está bordeado por los genes M y M2, en dirección 3'-5' del vRNA (Figura 2), lo cual es una característica de los miembros del género *Metapneumovirus* que los distingue de los *Pneumovirus* (van den Hoogen et al., 2002). La proteína F tiene un tamaño de 539 aminoácidos cuya secuencia, como ya se ha comentado, está altamente conservada entre los dos linajes del MNVH (94-97% identidad de secuencia aminoacídica) y comparte características estructurales con las proteínas de fusión de otros paramixovirus (Morrison, 1988).

La proteína F es un homotrímero (Calder et al., 2000, Russell et al., 1994) en el que cada protómero se sintetiza como un precursor inactivo (**F0**) que debe procesarse proteolíticamente para que la proteína sea biológicamente activa, dando lugar a la formación de dos cadenas, **F1** y **F2**, que se mantienen unidas covalentemente por dos puentes disulfuro (Figura 6). La proteína F del MNVH se procesa proteolíticamente en la superficie celular o en la partícula viral por proteasas tipo tripsina (Shirogane et al., 2008) en el sitio de corte 99-RQSR-102. Por ello el MNVH es dependiente de la presencia de tripsina en el medio de cultivo para su propagación en cultivos celulares.

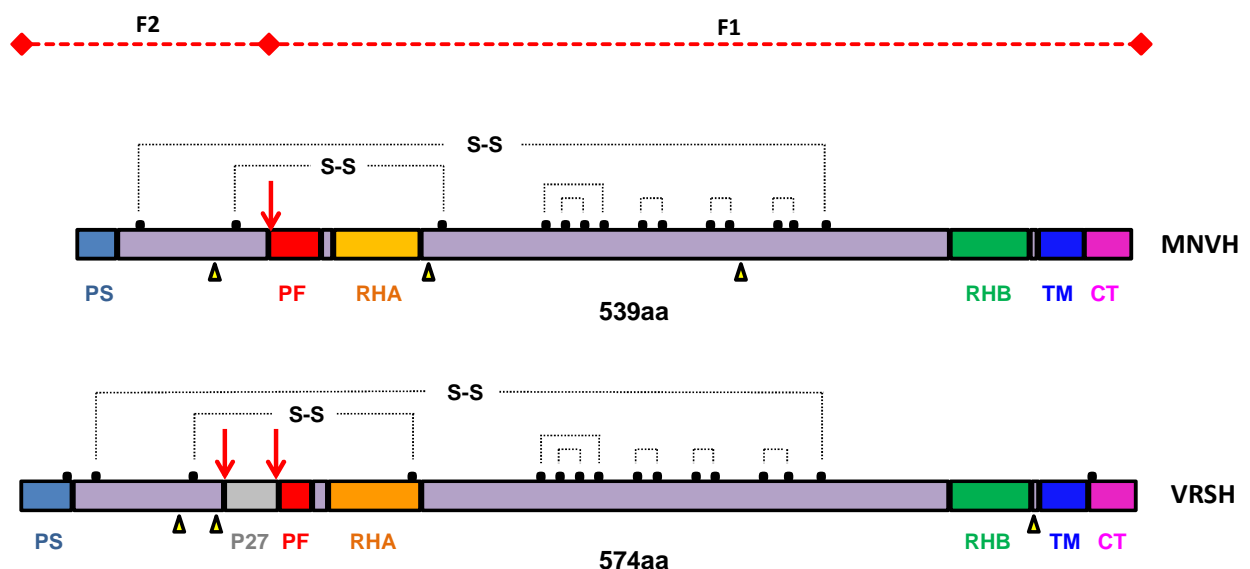


Figura 6. Esquema comparativo de la estructura primaria de la proteína de fusión F del MNVH y del VRSH. En la parte superior se muestra un esquema de la F del MNVH. **PS:** péptido señal, **PF:** péptido de fusión; **RHA:** región heptádica A; **RHB:** región heptádica B; **TM:** región transmembrana y **CT:** cola citoplasmática. En la parte inferior se muestra un esquema de la F del VRSH que además de las regiones mencionadas contiene el péptido 27 (**P27**). Las flechas rojas indican los sitios de procesamiento proteolítico. Los puntos negros indican los residuos de cisteína. Los triángulos amarillos representan los sitios de N-glicosilación y las líneas discontinuas los puentes disulfuro (**S-S**).

El precursor F0 tiene tres regiones hidrofóbicas (Figura 6): 1) una en el extremo N-terminal que se denomina péptido señal (**PS**) y que no está presente en la proteína madura ya que se elimina tras la traslocación del polipéptido naciente al retículo endoplasmático durante su síntesis, 2) otra cerca del extremo C-terminal llamada región transmembrana (**TM**) que sirve para que la proteína se ancle en la membrana del virus y de la célula infectada y 3) una tercera región hidrofóbica en el extremo N-terminal de la cadena F1 denominada péptido de fusión (**PF**) que se inserta en la membrana de la célula diana durante el proceso de fusión de membranas.

La cadena F1 tiene 12 residuos de cisteína (Cys), 10 de ellos se encuentran en la región central formando puentes disulfuro intercatenarios, y los otros dos residuos forman puentes disulfuro con las dos Cys de la cadena F2 manteniendo unidas covalentemente las dos cadenas como ya se ha mencionado (Figura 6). La proteína F del MNVH comparte 7 de los residuos Cys de la cadena F1 y uno de la cadena F2 con el resto de paramixovirus (van den Hoogen et al., 2002). Por otro lado, la proteína F del MNVH tiene 3 sitios de N-glicosilación.

Como en el resto de los paramixovirus, la proteína F tiene dos regiones heptádicas en la cadena F1, denominadas **RHA** y **RHB**, adyacentes al PF y a la región TM (Figura 6). Esas regiones son importantes para la estabilización de la estructura post-fusión que adopta la proteína una vez producida la fusión de membranas (ver más adelante). Así mismo, péptidos derivados de la RHB de la proteína F del VRSH inhiben el proceso de fusión de membranas (Lambert et al., 1996).

En el caso de la proteína F del VRSH (al igual que en otros paramixovirus), se ha observado que péptidos derivados de las RHA y RHB mezclados en solución en cantidades equimolares forman un complejo de seis α -hélices (Matthews et al., 2000, Zhao et al., 2000, Lawless-Delmedico et al., 2000). Este complejo se pudo cristalizar y determinar su estructura atómica por cristalografía de rayos X (Figura 7), observándose un “core” de tres α -hélices enrolladas entre sí, recubierto antiparalelamente por tres α -hélices de la RHB (Zhao et al., 2000). No se ha obtenido aún una estructura atómica de la región equivalente de la proteína F del MNVH, pero Miller y colaboradores han demostrado que péptidos derivados de las RHA y RHB del MNVH también forman un complejo de seis α -hélices (Miller et al., 2007). Además, péptidos derivados de la RHA del MNVH inhiben el proceso de fusión de membranas mediado por la proteína F de este virus.

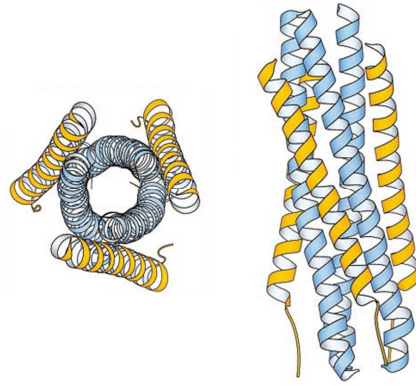


Figura 7. Estructura del haz de seis α -hélices de la proteína F del VRSH. Las hélices de la RHA están coloreadas en azul y las de la RHB en amarillo. Tomado de Zhao et al., 2000.

Aunque la proteína F del MNVH tiene un 33% de identidad de secuencia aminoacídica con la proteína F del VRSH (van den Hoogen et al., 2002) y ambas proteínas comparten dominios estructurales característicos de las proteínas F de los paramixovirus (Figura 6), tienen también diferencias significativas. La más notoria radica en el modo de procesamiento proteolítico. Mientras que el precursor F0 de la proteína F del MNVH tiene un único sitio de corte reconocido por proteasas tipo tripsina tras el residuo Arginina 102, el precursor de la proteína F del VRSH posee los sitios de corte I (106-RARR-109) y II (131-KKRKRR-136) que son reconocidos por proteasas del tipo furina (Gonzalez-Reyes et al., 2001, Zimmer et al., 2002) (Figura 6). El doble procesamiento proteolítico de la proteína F del VRSH implica la liberación de la región situada entre ambos sitios de corte, denominada péptido 27 (**P27**) (Gonzalez-Reyes et al., 2001) que está ausente en la proteína F del MNVH. Mutantes de la proteína F del VRSH con cambios en los sitios de corte I o II son deficientes en inducir la formación de sincitios en cultivos celulares, lo que indica que el doble procesamiento proteolítico es necesario para que la proteína F sea activa y promueva la fusión de membranas (Gonzalez-Reyes et al., 2001).

5. Proceso de fusión de membranas promovido por la proteína F del MNVH y de otros paramixovirus

El MNVH, como el VRSH y otros paramixovirus entra en la célula hospedadora a través de la fusión de la membrana viral y celular mediada por la proteína de fusión F (Lamb, 1993). En 2006 Yin y colaboradores propusieron el modelo de fusión de membranas que se ilustra en la Figura 8 (Yin et al., 2006). Según este modelo, la proteína F se encuentra en la membrana viral en una conformación meta-estable, denominada pre-fusión. Esta estructura está formada por una “cabeza” voluminosa unida a la membrana del virus por un tallo de α -hélices superenrolladas formadas por las RHB de cada protómero. Cuando el virus se une a la superficie celular, la proteína F se activa e inicia una serie de cambios conformacionales (todavía no bien conocidos) a través de intermedios estructurales. Uno de estos intermedios es

el denominado “pre-hairpin” en el que los aminoácidos de las RHA, que están formando α -hélices cortas unidas por “loops” en la cabeza de la proteína pre-fusión, se reorganizan en tres α -hélices largas superenrolladas, localizándose el péptido de fusión en su extremo N-terminal que se inserta en la membrana de la célula diana. El repliegamiento posterior de este intermedio “pre-hairpin” inestable conduce al acercamiento de las membranas viral y celular y a la formación de una estructura muy estable de la proteína F, denominada post-fusión que facilita el intercambio lipídico y la formación del poro de fusión por donde se libera la nucleocápsida al citoplasma celular. La estabilidad de la forma post-fusión de la proteína F se debe en gran medida a la formación del haz de seis α -hélices (6HB) formadas por las RHAs y RHBs de los tres protómeros. La energía liberada al pasar la proteína F de un estado poco estable (pre-fusión) a otro más estable (post-fusión) conduce el proceso de fusión de membranas de manera irreversible sin necesidad de energía externa.

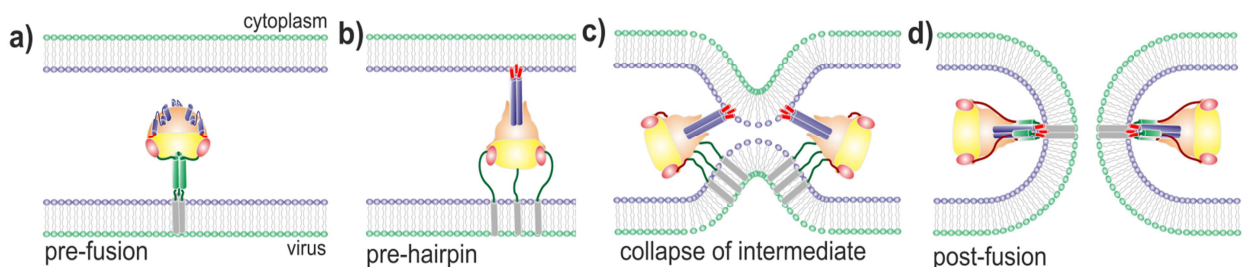


Figura 8. Modelo de fusión de membranas mediado por la proteína F de los paramixovirus. a) Trímero de la proteína F en estado pre-fusión anclado en la membrana viral a través de la región transmembrana. b) Tras su activación, las RHBs (verde) se separan y las RHAs (azul) se reorganizan en una estructura de α -hélices largas superenrolladas que implica además la exposición del PF (rojo) y su inserción en la membrana celular, formándose el intermedio estructural denominado “pre-hairpin”. c) Repliegamiento del “pre-hairpin” que conduce al acercamiento de las dos membranas. d) Ensamble de las 6HB (“six hélix bundle”) que finaliza con el intercambio lipídico entre ambas membranas y la formación del poro de fusión. Tomado de Melero y Mas, 2015.

En la subfamilia *Paramixovirinae* la activación de la proteína F se produce tras la unión del virus a la superficie celular a través de la proteína de unión al receptor (HN, H o G). Esta unión favorece la interacción de la proteína de unión al receptor con la proteína F provocando la activación de esta para el inicio de la fusión de las membranas viral y celular y la liberación del genoma viral en el citoplasma celular (Lamb et al., 2012). En cambio, el MNVH y el VRSH (subfamilia *Pneumovirinae*) no requieren la presencia de la proteína G para la activación de la proteína F. Así, mutantes del MNVH y del VRSH que carecen de la proteína G (ΔG) son capaces de infectar células “in vitro” por lo que, al menos en estos casos, la proteína G es dispensable para la activación de la proteína F, produciéndose entonces la unión del virus a la célula mediante la proteína F (Biacchesi et al., 2004, Biacchesi et al., 2005, Karron et al., 1997, Techaarpornkul et al., 2001, Teng et al., 2001). En el caso del MNVH, varios autores proponen la unión de la proteína F a integrinas celulares a través del dominio RGD conservado

de la cadena F1 (Cseke et al., 2009, Cox et al., 2012) o a heparán sulfato (Chang et al., 2012). Cox y colaboradores proponen un modelo de unión de la proteína F del MNVH a la membrana celular con varios pasos en el que primeramente la proteína F se uniría a heparán sulfato para después unirse a receptores proteicos específicos, incluyendo las integrinas, lo cual activaría los eventos post-unión de la proteína permitiendo una infección productiva (Cox et al., 2013). En el caso del VRSH, se ha descrito que la proteína F se une a proteoglicanos de la superficie celular (Hallak et al., 2007, Martinez et al., 2000, Techaarpornkul et al., 2002) así como a la nucleolina de la superficie de la célula (Tayyari et al., 2011). Estas interacciones de las proteínas F del MNVH y del VRSH con distintos componentes celulares pueden ocurrir también en los virus “wild type”, aunque estas sean más evidentes en virus que carecen de la proteína G (Melero et al., 2015).

La activación de la proteína F de los paramixovirus y la posterior fusión de membranas se produce en general a pH neutro (Lamb et al., 2013). Para la proteína F del MNVH, inicialmente se postuló que el pH ácido podría ser necesario para su activación (Schowalter et al., 2006) de manera análoga a como ocurre con otras proteínas de fusión tipo I como por ejemplo la hemaglutinina del virus de la gripe (Skehel et al., 1982). Sin embargo, trabajos posteriores han descartado que este fenómeno suponga un mecanismo general de activación de la proteína F del MNVH. Herfst y colaboradores observaron que en células transfectadas, las proteínas F de cepas del sublinaje A1 (minoritarias entre todas las cepas del MNVH) requerían un pulso de pH ácido para fusionar células mientras que las proteínas F de cepas del sublinaje A2 y del linaje B eran capaces de inducir la formación de sincitios de manera independiente al pH (Herfst et al., 2008b). Un extenso análisis de mutantes de proteínas F de ambos linajes ha permitido identificar cuatro residuos variables determinantes de la dependencia o no de pH ácido para fusionar membranas (Mas et al., 2011). Se ha postulado que las interacciones mediadas entre esos cuatro residuos (294, 296, 396 y 404) y dos histidinas conservadas (368 y 435) cercanas en la estructura de la proteína F del MNVH en la conformación pre-fusión son las responsables del requerimiento de pH ácido para la activación de la proteína F y la formación de sincitios en cultivos celulares de cepas pertenecientes al sublinaje A1.

En los últimos años se han descrito las estructuras atómicas de las proteínas F de varios paramixovirus, tanto en la conformación pre-fusión (McLellan et al., 2013b, McLellan et al., 2013a, Yin et al., 2006, Wen et al., 2012), como en la conformación post-fusión (McLellan et al., 2011, Swanson et al., 2010, Yin et al., 2005) lo que ha ayudado a entender en gran medida los cambios estructurales que experimentan esas proteínas durante el proceso de fusión de membranas. En lo que se refiere a esta Tesis, las estructuras más relevantes son las que se

muestran en la Figura 9 y que corresponden a la proteína F del VRSH en las conformaciones pre- y post-fusión y a una estructura parcial de un monómero de la proteína F del MNVH en la conformación pre-fusión unido al Fab del anticuerpo monoclonal DS7.

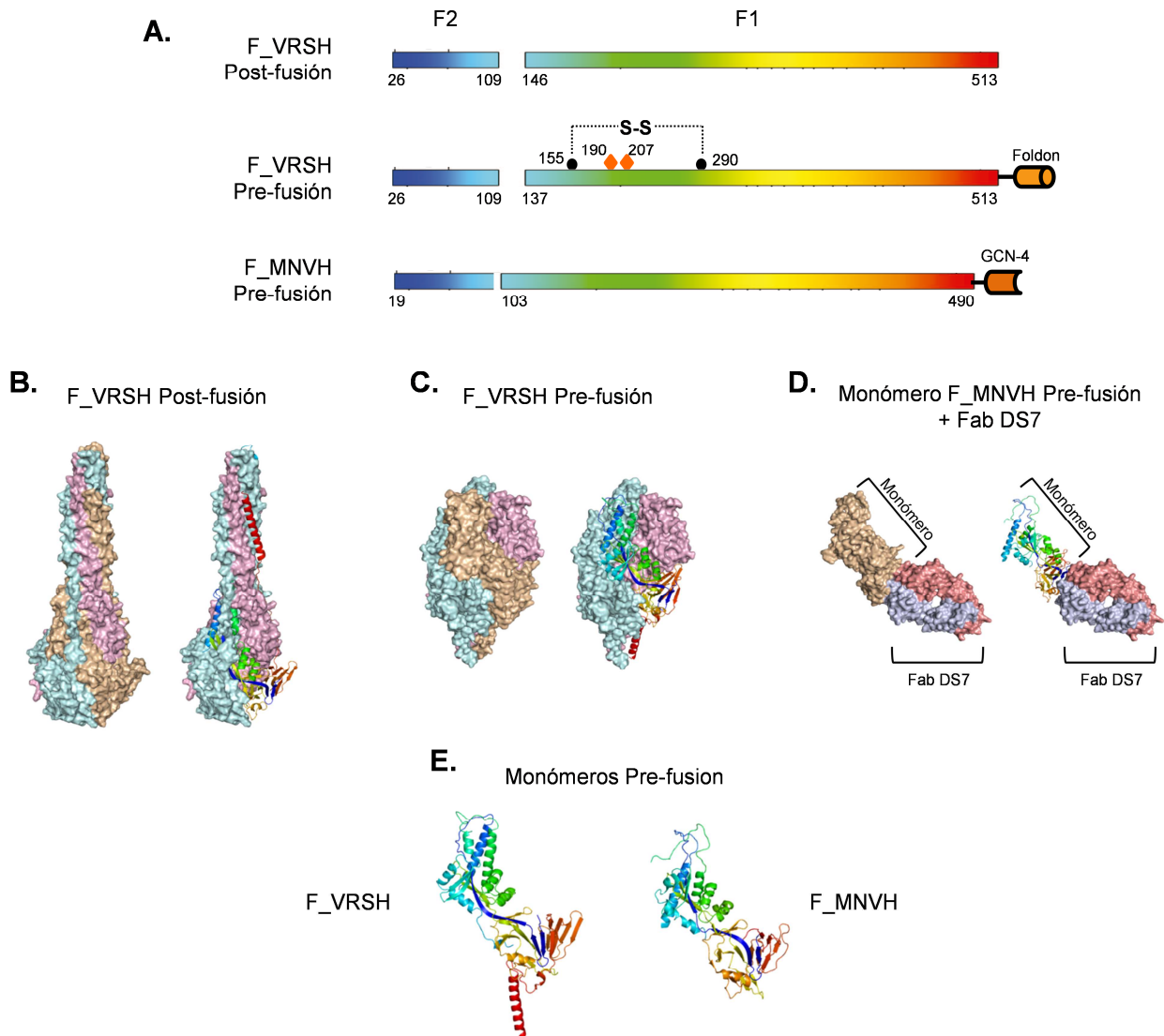


Figura 9. Estructuras atómicas de la proteína F del VRSH en las conformaciones pre- y post-fusión y estructura parcial de un monómero de la proteína F del MNVH en la conformación pre-fusión. **A)** Esquema de las construcciones de las proteínas F maduras con la que se obtuvieron las estructura atómicas que se muestran en los paneles B, C, D y E. Están coloreadas en modo arcoíris que empieza en el extremo N-terminal de la cadena F2 en azul, hasta el extremo C-terminal de la cadena F1 en rojo. En la proteína F_VRSH post-fusión la cadena F1 comienza en el aminoácido (aa) 146 debido a la delección de parte del péptido de fusión. Se indican las modificaciones introducidas en la proteína F_VRSH para obtener la estructura de la conformación pre-fusión: sustitución de los aa 155 y 290 por cisteínas (puntos negros) para inducir la formación de un puente disulfuro intercatenario (línea discontinua), sustitución de los aa 190 y 207 (rombos naranjas) por aa hidrofóbicos de gran tamaño para llenar cavidades de la cabeza de la proteína y adición del motivo foldon en el extremo C-terminal. A la proteína F_MNVH se le añadió el motivo GCN-4 en el extremo C-terminal. **B)** Representación de superficie de la proteína F_VRSH en la conformación post-fusión (código PDB 3RRR), a la derecha uno de los protómmeros se representa en estructura secundaria coloreada en modo arcoíris. **C)** Representación de superficie de la proteína F_VRSH en la conformación pre-fusión (código PDB 4MMV), uno de los protómmeros se representa en estructura secundaria coloreada en modo arcoíris. **D)** Representación de superficie de la estructura parcial de un monómero de la proteína F_MNVH unido al Fab del AcM DS7 (código PDB 4DAG), a la derecha el monómero se muestra en estructura secundaria coloreada en modo arcoíris. **E)** Estructuras secundarias completa y parcial de los monómeros de las proteínas F_VRSH y F_MNVH en la conformación pre-fusión.

En primer lugar se describió la estructura de una forma soluble de la proteína F del VRSH estabilizada en la conformación post-fusión, a la que se le había delecionado la región transmembrana y la cola citoplasmática, por lo que esta proteína se secreta al medio extracelular, de donde se puede purificar en ausencia de detergentes (McLellan et al., 2011) (Figura 9-A). Además, a esta proteína se le delecionaron los aminoácidos 137-146 del péptido de fusión para evitar agregaciones en rosetas (Ruiz-Arguello et al., 2004). La estructura atómica tiene forma de cono como la observada con anterioridad al visualizar una construcción similar de la proteína F del VRSH soluble al microscopio electrónico (Calder et al., 2000). El tallo de la proteína está formado por el haz de seis α -hélices (6-HB) mencionado anteriormente, formado por las secuencias de las RHA y RHB. La cabeza tiene forma angular y está formada por el resto de la cadena F1 y la cadena F2 (McLellan et al., 2011) (Figura 9-B).

La determinación de la estructura de la proteína F del VRSH en la conformación pre-fusión exigía su estabilización en esa conformación, puesto que la proteína F desprovista de la región transmembrana se reorganiza espontáneamente en la conformación post-fusión. Para ello se añadió el dominio de trimerización “foldon” al extremo C-terminal del ectodominio, lo que venía a suponer el reemplazamiento de la región transmembrana de la proteína F por ese dominio de trimerización de la fibritina del bacteriófago T4, sin impedir la secreción de la proteína soluble al medio extracelular. Esta proteína se co-expresó con un anticuerpo monoclonal específico de la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH formándose así un inmunocomplejo que se puede cristalizar y determinar su estructura atómica, revelando la estructura pre-fusión de la proteína F (McLellan et al., 2013b). Posteriormente se hicieron construcciones en las que se introdujeron una serie de mutaciones en el ectodominio de la proteína F del VRSH (Figura 9-A). Estas mutaciones junto con la presencia del motivo “foldon” fueron suficientes para estabilizar el ectodominio en la conformación pre-fusión en ausencia de anticuerpos y poder determinar su estructura (McLellan et al., 2013a) (Figura 9-C). Esta conformación tiene forma de seta con una cabeza globular y un tallo formado por α -hélices superenrolladas de las RHB de los tres protómeros. La cabeza está formada por el resto de la cadena F1 y la cadena F2 de cada protómero. La RHA está localizada en la parte superior de la cabeza formando α -hélices cortas conectadas entre sí por “loops” y el péptido de fusión está situado en el interior de la cavidad de la cabeza protegida del medio acuoso.

De la proteína F del MNVH únicamente se dispone de la estructura atómica parcial de un monómero de la proteína unido al Fab del anticuerpo monoclonal (AcM) DS7 (Wen et al., 2012) (Figura 9-D). Para ello, Wen y colaboradores diseñaron una construcción soluble de la proteína F del MNVH a la que añadieron el dominio de trimerización GCN-4 en el extremo C-terminal (Figura 9-A). Intentaron co-cristalizar la proteína F trimérica con el Fab del AcM DS7

pero únicamente obtuvieron la estructura parcial de uno de los monómeros de la proteína F unido a dicho Fab (Figura 9-D). Si se compara la estructura secundaria parcial del monómero de la proteína F del MNVH con la estructura de un monómero de la proteína F del VRSH en la conformación pre-fusión se observa que tienen un gran parecido (Figura 9-E).

En la actualidad no se dispone de la estructura atómica de la proteína F del MNVH en su conformación post-fusión. En nuestro laboratorio, Lorena Ver generó un virus vaccinia recombinante que expresaba una forma soluble de la proteína F del MNVH del sublinaje B1 (F_{TM_B1}). El procesamiento y el análisis tridimensional de las imágenes obtenidas al microscopio electrónico de esta construcción mostraron que adopta una estructura trimérica en forma de cono de aproximadamente 17nm de longitud con una cabeza angular y un largo tallo, similar a la conformación post-fusión de la proteína F del VRSH. Sin embargo, el pobre rendimiento obtenido con esta construcción no permitió abordar la cristalización de la molécula. Uno de los objetivos de este trabajo y que se desarrollará en los siguientes apartados fue la obtención de una construcción soluble de la proteína F del MNVH en su conformación post-fusión con un rendimiento elevado para poder realizar los estudios mencionados.

Si se comparan las estructuras de uno de los monómeros de la proteína F del VRSH en la conformación pre- y post-fusión (Figura 10) se observa que la mayoría de las estructuras secundarias son compartidas entre ambas conformaciones (no hay diferencias de más de 5 Å entre los aminoácidos), excepto en las regiones N- y C-terminal (RHA y RHB, respectivamente) de la cadena F1 donde se observan grandes cambios conformacionales (McLellan et al., 2013b). La RHA cambia de estar formando α -hélices cortas a formar un trímero de α -hélices largas superenrolladas con los péptidos de fusión en sus extremos. La RHB de la conformación pre-fusión se repliega y rodea a la RHA en la conformación post-fusión dando lugar en el trímero a la formación del haz de seis α -hélices superenrolladas (6HB) característico de las proteínas de fusión tipo I en dicha conformación. Las estructuras de las dos conformaciones de la proteína F del VRSH descritas en los párrafos anteriores apoyan el modelo propuesto anteriormente para el proceso de fusión de membranas.

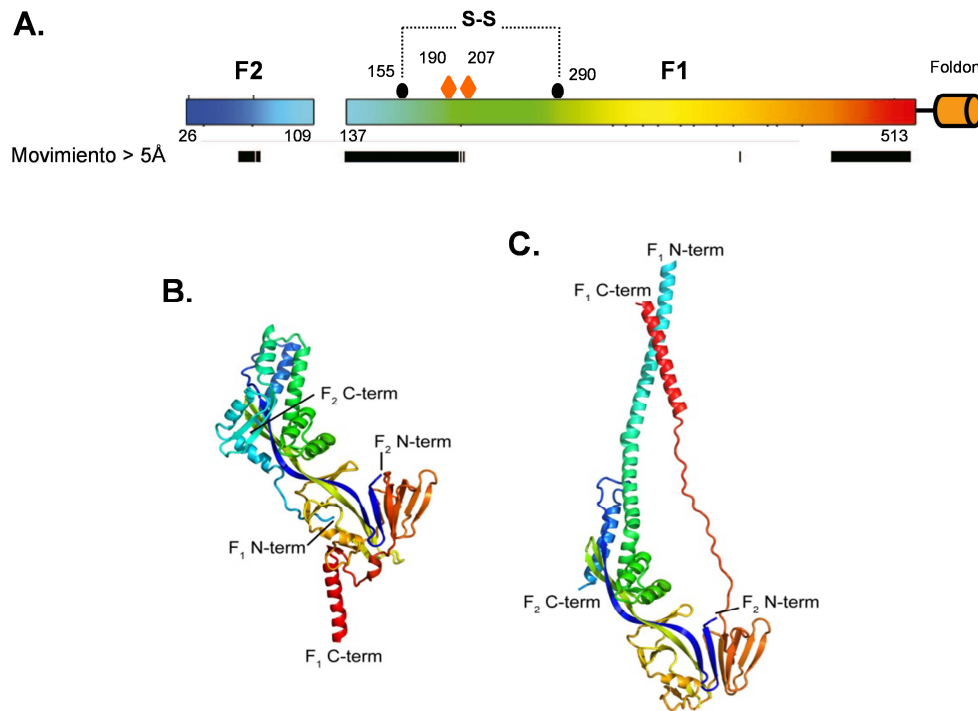


Figura 10. Reordenamiento estructural de la proteína F del VRSH. A) Esquema de la proteína F con la que se obtuvo la estructura atómica en la conformación pre-fusión. Está coloreada como un arcoíris que empieza en el extremo N-terminal de la cadena F2 en azul, hasta el extremo C-terminal de la cadena F1 en rojo. Los aminoácidos que sufren un movimiento mayor de 5 Å entre el estado pre- y post-fusión se indican con barras negras. **B)** Estructura atómica de un monómero en la conformación pre-fusión. **C)** Estructura atómica de un monómero en la conformación post-fusión. Tomado de McLellan et al., 2014a.

6. Respuesta inmune frente al MNVH

La respuesta inmune juega un papel determinante en la protección y en la recuperación de la infección por el MNVH al igual que ocurre con el VRSH. En ambos virus los anticuerpos neutralizantes juegan un papel primordial en la protección frente a la infección, mientras que la respuesta celular tiene un papel más significativo en la eliminación del virus y en la respuesta inmunopatológica. Tras la infección de células diana por el MNVH (células epiteliales del tracto respiratorio, macrófagos y células dendríticas) se induce la producción local de citoquinas y quimioquinas que dan lugar a una respuesta inflamatoria en la zona infectada. Esta respuesta juega un papel importante en la patología asociada a la infección por el MNVH así como a la infección por el VRSH y por otros virus respiratorios como gripe o virus de la parainfluenza humana (Collins et al., 2013).

6.1. Respuesta humoral

La prevalencia de anticuerpos circulantes frente al MNVH en mayores de 10 años es del 100%, indicando que todas las personas se han infectado al menos una vez por este virus (van den Hoogen et al., 2001). En el suero de niños recién nacidos hay anticuerpos neutralizantes frente al MNVH al igual que frente al VRSH o frente a otros patógenos comunes,

que se transfieren a través de la placenta materna desde la semana 26 de gestación hasta el nacimiento del niño (Crowe, Jr. 2001). Estos anticuerpos son los responsables de que los niños estén protegidos frente a una infección por el MNVH aproximadamente durante los dos primeros meses de vida. Por ello, un factor de riesgo para la infección por el MNVH como por el VRSB es que el niño sea prematuro. Pasados los dos meses de vida, el título de anticuerpos maternos va disminuyendo y es entre los dos y seis meses de vida cuando los niños son más susceptibles de infectarse por el virus. En estos niños los niveles de anticuerpos producidos después de una infección natural por el VRSB no son muy elevados, debido probablemente a la falta de madurez del sistema inmune. A medida que los niños van creciendo se producen múltiples reinfecciones y los niveles de IgG e IgA contra las proteínas F y G del VRSB van en aumento. En el caso del MNVH hay menos estudios en este aspecto pero se asume que la respuesta es similar a la producida frente al VRSB (Collins et al., 2013).

Además de las IgG circulantes en el suero, los anticuerpos tipo IgA de las mucosas y del lumen respiratorio tienen un papel protector importante en las reinfecciones por diversos agentes infecciosos (Freihorst et al., 2001). Estudios realizados en animales demostraron que existe una relación directa entre los niveles de IgA específicos contra el MNVH en el tracto respiratorio y los niveles de protección (Mok et al., 2008) como sucede en el caso del VRSB. Para el VRSB además hay estudios en humanos que corroboran que hay una correlación entre los niveles de IgA en el tracto respiratorio y protección frente a una infección. Sin embargo, debido a la corta vida de las IgAs, la protección mediada por estos anticuerpos es menor que la proporcionada por las IgGs (Singleton et al., 2003).

En modelos animales se ha demostrado que la glicoproteína F es el único antígeno viral capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes y protectores frente al MNVH (Biacchesi et al., 2005, Skiadopoulos et al., 2004, Skiadopoulos et al., 2006, Mok et al., 2008). Por el contrario, los anticuerpos inducidos contra la proteína G no protegen frente a la infección, siendo esta una diferencia importante con el VRSB (Ryder et al., 2010). Estudios más recientes, han demostrado que la administración pasiva de anticuerpos monoclonales (AcMs) o fragmentos Fab dirigidos frente a la proteína F del MNVH en distintos modelos animales (ratones DBA/2, ratones BALB/c, "cotton rats") protege frente a un desafío por el MNVH (Biacchesi et al., 2005, Corti et al., 2013, Hamelin et al., 2010, Schuster et al., 2014, Williams et al., 2007, Ulbrandt et al., 2006).

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se demostró que la mayor parte de la actividad neutralizante frente al VRSB de preparaciones comerciales de Igs humanas residía en anticuerpos dirigidos frente a la proteína F del virus, que no eran eliminados al pasarlos por una columna de inmutafinidad que tenía unida covalentemente una conformación post-fusión de

esa proteína (Sastre et al., 2005, Magro et al., 2012). Puesto que los anticuerpos así deplecionados eran capaces de unirse a una preparación de proteína F estabilizada en la conformación pre-fusión, se concluyó que la mayor parte de la actividad neutralizante de la respuesta inmune en humanos residía en anticuerpos específicos de la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH (Magro et al., 2012). Este tipo de anticuerpos específicos de la conformación pre-fusión de esta proteína se indujeron también en conejos inmunizados con un virus vaccinia recombinante que expresaba la forma completa de la proteína F del VRSH (Magro et al., 2012), mientras que no se indujeron por un virus vaccinia recombinante que expresaba una forma soluble (desprovista de la región transmembrana) de la proteína F. Es decir, que la inducción de anticuerpos neutralizantes específicos de la forma pre-fusión de la proteína F del VRSH es aparentemente dependiente de que esa proteína se presente al sistema inmune expuesta en la superficie celular. Este tipo de análisis no se ha realizado aún para los anticuerpos neutralizantes frente al MNVH y es en gran parte el trabajo de esta Tesis.

Sitios antigénicos de las proteínas F de los Pneumovirus

La localización de epítomos reconocidos por anticuerpos neutralizantes en las estructuras primarias de las proteínas F del MNVH y del VRSH se abordó originalmente mediante el aislamiento y secuenciación de virus resistentes a anticuerpos monoclonales (AcM) murinos (Arbiza et al., 1992, Ulbrandt et al., 2008, Beeler et al., 1989, Lopez et al., 1998, Arbiza et al., 1992). Se observó que los epítomos se concentraban en ciertas regiones que se denominaron sitios antigénicos y que se muestran esquemáticamente en la Figura 11 para las proteínas de ambos virus. Los sitios antigénicos 2, 3, 4 y 5/6 de la proteína F del MNVH se localizan más o menos en regiones equivalentes a los sitios antigénicos \emptyset , II y IV de la proteína F del VRSH, lo que sugiere que ambas proteínas tienen estructuras antigénicas parecidas.

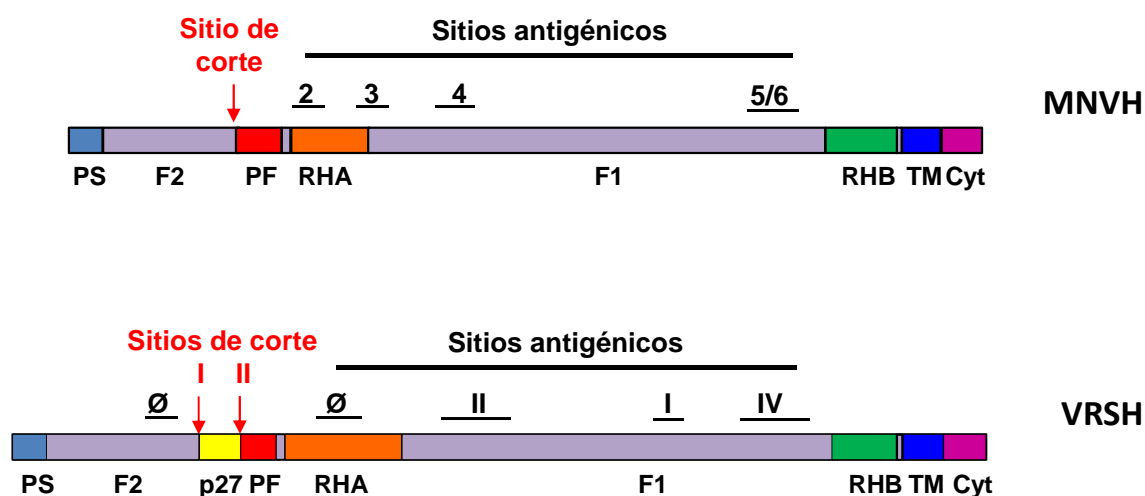


Figura 11. Esquema de la estructura primaria de las proteínas F del MNVH y del VRSH con sus distintas regiones y con los sitios antigénicos.

Más recientemente, la localización de sitios antigénicos en la estructura tridimensional de la proteína F del VRSH se abordó primero por microscopía electrónica de inmunocomplejos de anticuerpos y una proteína F del VRSH soluble (Calder et al., 2000) y posteriormente mediante la cristalización de dichos complejos y determinación de su estructura atómica por difracción de rayos X (McLellan et al., 2011). Esta última metodología ha permitido la identificación y localización de epítomos reconocidos por AcMs específicos de la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH en el sitio Ø de la misma (McLellan et al., 2013b). Los AcMs que se unen al sitio Ø han resultado ser los más potentes en ensayos de neutralización, apoyando la idea expresada anteriormente de que la mayor parte de la actividad neutralizante de inmunoglobulinas humanas se debe a anticuerpos dirigidos frente a epítomos específicos de la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH. En el caso de la proteína F del MNVH, si bien los sitios 2 y 3 identificados comprenden regiones homólogas a las del sitio Ø de la F del VRSH, hasta el momento se desconoce si esos epítomos están presentes únicamente en la conformación pre-fusión de la proteína.

6.2. Respuesta celular

Resultados obtenidos en ratones BALB/c a los que se les eliminaron con anticuerpos específicos los linfocitos T o las células “natural killer” (NK), pusieron de manifiesto la implicación de ambos tipos celulares en la eliminación del MNVH tras una infección (Alvarez et al., 2004). Así, se observó mayor título viral en los pulmones de los ratones deplecionados sobre todo de células NK, que en ratones control. En otro estudio donde ratones BALB/c se deplecionaron de linfocitos T CD4⁺, de linfocitos T CD8⁺ o de ambos tipos celulares, se observó que, tras la infección por el MNVH, el título de virus en los pulmones de los ratones donde ambos linfocitos T se habían eliminado fue mayor que en los ratones control. Sin embargo, la pérdida de peso así como los efectos histopatológicos observados en los pulmones fueron menores en los ratones sin linfocitos T, sugiriendo que la respuesta inmunológica para la eliminación del virus contribuye al desarrollo de la enfermedad (Kolli et al., 2008).

Se ha comprobado que el MNVH infecta células dendríticas interfiriendo en la activación y posterior proliferación de linfocitos T CD4⁺ y por ello la respuesta inmune a largo plazo puede estar deteriorada (Cespedes et al., 2013). En comparación con el VRSH, se ha visto que en lavados nasales de niños con infecciones por el MNVH la producción de citoquinas pro-inflamatorias es menor, a pesar de que la sintomatología observada y la gravedad eran similares (Laham et al., 2004). En ese estudio se propone que a pesar de que la patología producida por el MNVH y el VRSH es igual, la enfermedad puede producirse por mecanismos distintos.

Los mecanismos de respuesta celular inducidos por el MNVH son todavía bastante desconocidos. Lo que sí es evidente es la importancia de la participación de ambas ramas del sistema inmune, humoral y celular, en la protección y en la recuperación frente a la infección por el MNVH.

7. Tratamiento y prevención

La mayoría de los niños infectados por el MNVH no necesitan ser ingresados en el hospital. A los niños que requieren hospitalización se les da cuidados paliativos tales como eliminación mecánica de secreciones, administración de oxígeno humidificado, administración de fluidos intravenosos y, en los casos más severos, asistencia respiratoria y ventilación mecánica.

No existe un tratamiento específico frente a la infección por el MNVH. La ribavirina (un análogo de nucleósido) es un antiviral de amplio espectro que exhibe una actividad potente frente al MNVH y al VRSV en cultivos celulares y en modelos animales (Wyde et al., 2003, Hamelin et al., 2006). Este antiviral se ha utilizado en dos casos clínicos publicados en los que los pacientes se recuperaron de la infección por el MNVH. Uno de los pacientes era un trasplantado de pulmón con neumonía grave al que se le aplicó ribavirina intravenosa (Raza et al., 2007), mientras que al otro paciente, un niño inmunocomprometido con neumonía, se le trató con ribavirina intravenosa combinada con inmunoglobulinas intravenosas (IGIV) (Kitanovski et al., 2013). A pesar de ello, la ribavirina tiene un uso muy limitado en clínica por su falta de eficacia probada a nivel general y por la dificultad en su modo de su administración, en general en forma de aerosoles.

En el caso del VRSV, en pacientes con elevado riesgo de sufrir una infección por el VRSV se empezó a utilizar como medida profiláctica el RespiGam, que es una preparación de inmunoglobulinas humanas purificadas a partir del plasma de donantes con elevados títulos de anticuerpos neutralizantes frente al VRSV. Actualmente el RespiGam ha sido reemplazado por el Palivizumab, que es un anticuerpo monoclonal (AcM) neutralizante y humanizado dirigido frente a la proteína F del VRSV.

Para el MNVH no hay un tratamiento profiláctico equivalente al Palivizumab; sin embargo, como ya se ha comentado en el apartado 6.1. hay varios estudios en modelos animales que ponen de manifiesto que la administración pasiva de AcMs dirigidos frente a la proteína F del MNVH tienen un efecto profiláctico y/o terapéutico frente a infecciones por este virus (Corti et al., 2013, Hamelin et al., 2010, Schuster et al., 2014, Ulbrandt et al., 2006, Williams et al., 2007).

En la actualidad no se dispone de ninguna vacuna para prevenir la infección por el MNVH ni por el VRSH por lo que el desarrollo de una vacuna segura y efectiva frente a ambos virus es un tema de gran interés. En el caso del MNVH, distintos grupos han probado virus atenuados originados por técnicas de genética reversa como posibles vacunas en hámster, monos verdes africanos o ratones obteniendo distintos grados de protección frente a una posterior infección por el MNVH (Biacchesi et al., 2004, Biacchesi et al., 2005, Buchholz et al., 2005, Liu et al., 2013). Se han probado también en hámster, “cotton rats”, y distintas especies de primates no humanos virus recombinantes que expresan la proteína F del MNVH obteniéndose protección frente a una posterior infección por el virus (Mok et al., 2008, Skiadopoulos et al., 2004, Tang et al., 2005b). Otros grupos han inoculado la proteína F del MNVH purificada (con distintos adyuvantes) en macacos, hámster sirio dorado o “cotton rats”, observándose producción de anticuerpos neutralizantes y diferentes grados de protección frente a una infección por el virus (Cseke et al., 2007, Herfst et al., 2007, Herfst et al., 2008c). En todos estos estudios se ha puesto en evidencia la importancia que tienen los anticuerpos anti-proteína F en la protección frente a una infección por el MNVH.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

Como ya se ha mencionado en la Introducción, la fusión de membranas llevada a cabo por la proteína F del MNVH juega un papel fundamental en el ciclo infectivo del MNVH. Además, la proteína F es la única glicoproteína capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes que confieren protección frente a una infección por el virus en modelos animales. Por tanto, la caracterización del tipo de anticuerpos que se inducen frente a esta proteína así como un mayor conocimiento de la estructura física y antigénica de la misma, son esenciales para el desarrollo de futuras medidas profilácticas y/o terapéuticas frente a la infección por el MNVH.

Por todo ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos frente al haz de seis α -hélices (6HB) de la proteína F del MNVH que permitan cuantificar e identificar de manera exclusiva esta proteína en su conformación post-fusión.
- Obtención de una forma soluble de la proteína F de una cepa representativa de cada uno de los linajes genéticos del MNVH (A y B) en la conformación post-fusión.
- Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales de conejo dirigidos frente a distintas construcciones de la proteína F del MNVH.
- Comparación de la respuesta de anticuerpos inducida en conejos por distintas construcciones de la proteína F del MNVH y construcciones equivalentes de la proteína F del VRSH.
- Comparación del tipo de anticuerpos neutralizantes presentes en una preparación de inmunoglobulinas humanas dirigidos frente a la proteína F del MNVH y frente a la proteína F del VRSH.
- Evaluación de cros-reactividades de anticuerpos policlonales y monoclonales entre la proteína F del MNVH y la proteína F del VRSH.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Líneas celulares

- Vero-118: Clon de células Vero que han sido seleccionadas por una mayor resistencia a la tripsina. Las células originales provienen de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). American Type Culture Collection, ATCC: CCL-81.
- CV-1: Células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). American Type Culture Collection, ATCC: CCL-70.
- HEp-2: Células de carcinoma de laringe humano. American Type Culture Collection, ATCC: CCL-23.

1.2. Virus

- Metaneumovirus humano (MNVH) recombinantes que expresan la “Green Fluorescence Protein (GFP)” derivados de la cepa NL/1/99 (sublinaje B1) y cepa NL/1/00 (sublinaje A1) (Herfst et al., 2004) fueron cedidos por el Dr. Ron A. Fouchier (Erasmus Medical Center, Rotterdam, Holanda).
- Virus respiratorio sincitial humano (VRSH) cepa Long, aislada en Baltimore (Estados Unidos) en 1956. Los stocks empleados en el trabajo con un título de 1×10^6 unidades formadoras de placa (ufp)/célula fueron proporcionados por la Dra. Concepción Palomo Sanz.
- vRB12, virus vaccinia mutado, derivado de la cepa Western Reserve (WR), en el que el 93% de la secuencia que codifica para la proteína P37 está deletionada (Blasco et al., 1995).
- vTF7.3, virus vaccinia recombinante que expresa la RNA polimerasa del fago T7 (Fuerst et al., 1986).

1.3. Bacterias

- XL 10- Gold Ultracompetent Cells (Agilent Technologies). Células utilizadas como vector para la expresión de los plásmidos utilizados en este trabajo.
- *E. coli* BL21 Competent Cells (Agilent Technologies). Células utilizadas para la expresión de proteínas fusionadas a Glutación S-Transferasa (GST).

1.4. Animales

Conejos New Zealand se utilizaron para la obtención de los distintos sueros policlonales.

1.5. Anticuerpos

- El anticuerpo monoclonal 132 dirigido frente a la proteína F del MNVH fue cedido por la Dra. B. G. van den Hoogen (Erasmus Medical Center, Rotterdam, Holanda).

Anticuerpos monoclonales y policlonales disponibles en el laboratorio

- Cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a las proteínas F y G del VRSH utilizado para revelar las neutralizaciones (García-Barreno et al., 1989, Martínez et al., 1997).
- Anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la proteína F del VRSH 56F, 101F, 104F, 105F, 106F, 107F y 108F, cedidos por la Dra. Concepción Palomo Sanz.
- Anticuerpos policlonales dirigidos frente a distintas conformaciones de la proteína F del VRSH (Magro et al., 2012).
- Anticuerpos policlonales anti proteína F del MNVH, cedidos Lorena Ver.
- Anticuerpo monoclonal MF14 dirigido frente a la proteína F del MNVH, cedido por Eduardo Olmedillas.

1.6. Plásmidos

- pRB21: Clonaje y modificación del gen de la proteína F del MNVH de las cepas NL/1/00 (sublinaje A1) y NL/1/99 (sublinaje B1) para posteriormente obtener virus vaccinias recombinantes mediante el método de Blasco & Moss (Blasco et al., 1995).
- pGEX-5X-3: Clonaje de las regiones heptádicas A y B (RHA y RHB) de la proteína F del MNVH de la cepa NL/1/00 (sublinaje A1) y de ambas regiones heptádicas unidas por un linker para la producción y purificación de las mismas fusionadas a Glutatión S-Transferasa GST (GE Healthcare).
- pCAGGs_Fc_A1: Amplificación del gen de la proteína F de la cepa NL/1/00 para el posterior clonaje en el plásmido pRB21. Cedido por Dr. Ron A. Fouchier (Erasmus Medical Center, Rotterdam, Holanda).

1.7. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en el clonaje, mutagénesis y secuenciación de las distintas construcciones de la proteína F del MNVH de las cepas NL/1/00 y NL/1/99 (sublinaje A1 y B1) respectivamente se detallan en la Tabla 1.

	Oligonucleótido	Secuencia dirección 5' a 3'
Clonaje y Mutagénesis	B1_TM-Foldon +	gtgcgcaaagatggcgaatgggtgctgctgagcacctttctggaggcatagaaggaagacacc accatcatcatcattgaccatggaggcctaataaataattttat
	B1_TM-Foldon - 1	atagcctggccatcgcgccggcctccggaatagccgctgccattgtttctttctgactgttta gaatttgttgactggtccactagtcctgactgtt
	B1_TM-Foldon - 2	ttcgccatctttgcgcacatacgcctggccatcgcgccggcctccggaatagccgctgccattgt ttcctttctgactgtttagaattttgttgactggc
	F_MNVH_TEV +	aaaggaaacacttctggtcgtgaaaacttataattccaaggtggtggcagcggctatattccgg aagcggcgcgatggccaggcgtatgtgcgc
	B1_TEV -	aaaattctaacagtgagaaaaaggaaacacttctggtcgtgaaaacttataattccaaggtggt gt
	B1_Δ103-111 +	gttgctacagcagcagcagtcacagcaggcattgca
	B1_Δ103-111 -	agagaggagcaaattgaaaatcccagacaatcaaga
	B1_KKRKRR -	gagaggagcaaattgaaaatcccagacaatcaaagaaaaggaaaagaaga
	A1_EcoRI_1-15+	cgcgaaatcgggatgtcttgaaagtg
	A1_NcoI_1602-1620 -	cttcataccacataattagccatggcgt
	A1_TM-Xa_6His +	cctaagcagtcagagaaaggaaacactggaggcatagaaggaagacaccatcatcatc attagttcatcattgaataattctaattgctgtcc
	A1_TM-Xa_6His -	tccagtgttccttctctgactgcttaggattctgtt
	A1_TM-Foldon +	gtgcgcaaagatggcgaatgggtgctgctgagcacctttctggaggcatagaaggaagacacc accatcatcatcattgattcatcattgaataattctaattgctgt
	A1_TM-Foldon - 1	atagcctggccatcgcgccggcctccggaatagccgctgccattgtttctttctgactgctt aggattctgttgattgatccaccaaggcctgactgtt
	A1_TM-Foldon - 2	ttcgccatctttgcgcacatacgcctggccatcgcgccggcctccggaatagccgctgccattgt ttcctttctgactgcttaggattctgttgattgatc
	A1_TEV -	agaatcctaagcagtcagagaaaggaaacacttctggtcgtgaaaacttataattccaaggtggt ggt
	A1_Δ103-111 +	gttgcaactgcagctgcagttacagcagggttgca
	A1_Δ103-111 -	agagaggagcaaattgaaaatcccagacaacctaga
	A1_KKRKRR -	tcttcttcttcttcttagattgtctgggattttcaattgctcctctctgc
	A1_G294E +	gcagccccttctgttcagaaaaaagggaactatgct
	A1_G294E -	agcatagttccctttttctgaacaagaaggggctgc
	A1_Bam_F388-408 +	ggcggatcctgaaagtgaagtaacagca
	A1_Sal_linker_F505-528 -	ggcgtgactcagattgcacgtgttagattctt
	A1_Bam_F1336(T/C)-1356 +	ggcggatcctgaccagcaagtttctt
	A1_Not_F1444-1464	ggcggcggcctcagtttcttctgactgct
	A1_RHA_L_RHB 1.1 +	tcgtcggggggcgtgcagagaaacagtcaggcctggtggatcaatcaaacagaatcctaagca gtgcagagaaaggactgagcggccgcacatcgtgactgactgacgatc

	Oligonucleótido	Secuencia dirección 5´a 3´
	A1_RHA_L_RHB 1.2 +	tcgtcgggggctgcgaccagtcgaagtttctgaagatcaattcaatgttgacttgaccaagtttc gagagcattgagaacagtcaggccttggtgatcaatcaaa
	A1_RHA_L_RHB -	gtcgacgcccccgacgaccctgcacgtgttagattctgct
Secuenciación	F_MNVH_EcoRI_1-15 +	gacttcattgtcttgaaagt
	F_MNVH_575-593 +	gcttcagtcaattcaacag
	F_MNVH_575-593 -	ctgttgattgactgaagc
	F_MNVH_950-967 +	ctgttactacccaaatg
	F_MNVH_1596-1620 -	ctaactatgtggtatgaaaccgccg
	A1_EcoRI_1-15+	cgcgattcgggatgtcttgaaagt
	A1_NcoI_1602-1620 -	ctcataccacataattagccatggcgt
	pGEX +	gggctggcaagccagtttggtg
	pGEX -	ccgggagctgcatgtgtcagagg

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. El signo + indica que el oligonucleótido tiene la polaridad del mRNA del gen F y el signo – la complementaria.

1.8. Enzimas

- El kit de mutagénesis dirigida utilizado fue el de Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific).
- Los enzimas de restricción Eco RI, Nco I, Bam HI, Sal I, Not I utilizados en los clonajes los suministró Roche.
- Otros enzimas utilizados en la manipulación del DNA fueron: fosfatasa alcalina (USB/GE Healthcare), T4 DNA ligasa (Rapid DNA Ligation Kit, Roche), Ampli Taq DNA polimerasa (Applied Biosystems), enzima Dpn I (nzytech).
- La tripsina utilizada en las infecciones del MNVH fue suministrada por Sigma.

2 Medios de cultivo

2.1. Células eucariotas

- DMEM-10, DMEM-2,5, y DMEM-0: Medio Eagle modificado por Dulbecco (Lonza), con 4mM glutamina (Lonza), 100U/ml penicilina (Lonza), 0,1mg/ml de estreptomina (Lonza) y enriquecido con 10%, 2,5% suero de ternera fetal (STF) (Biowest) o sin suero, respectivamente.
- DMEM-agar: Medio DMEM (Biological industries) con 4mM glutamina, 100U/ml penicilina, 0,1mg/ml de estreptomina, 2,5% STF y 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco), y 0,7% de agar noble (Difco).

- IMDM-10 e IMDM-0: Medio Iscove modificado por Dulbecco (Lonza), con 4mM glutamina, 100U/ml penicilina, 0,1mg/ml de estreptomina y enriquecido con 10% STF o sin suero, respectivamente.
- Optimem: Medio utilizado para la transfección de células en cultivo, suministrado por Gibco.
- Tripsina-Verseno: 0,05% tripsina (Lonza), 0,02% EDTA (Merk) en PBS (Lonza).

2.2. Bacterias

- LB: suministrado por Nzytech.
- SOB: 2% bacto-Triptona (BD), 0,5% extracto de levadura (Difco), 10mM NaCl, 2,5mM KCl.
- NZY: 4% bacto-Triptona (BD), 2% extracto de levadura (Difco), 2% NaCl.
- Circlegrow: suministrado por Q-BIOgene.
- ONE: Overnight Express Instant TB Medium de Novagen.

3. Otros reactivos de laboratorio

- Los compuestos orgánicos (metanol, etanol, acetona...), persulfato amónico (PSA), ditrioteitol (DTT), dimetilsulfoxido (DMSO) e imidazol fueron suministrados por Merck.
- Los reactivos utilizados para realizar electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE): 30% acrilamida/Bis, 10% dodecil sulfato sódico (SDS), N-N-N'-N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED), azul de bromofenol, marcadores de peso molecular pre-teñidos (Precision Plus Protein Standards Dual color), 10% Tween-20, tampón 10% Tris/glicina/SDS; fueron suministrados por Bio-Rad
- Los reactivos utilizados para la separación de ácidos nucleicos mediante electroforesis en geles de agarosa se enumeran a continuación: agarosa suministrada por Conda, tampón 10% Tris/ ácido bórico/ EDTA (TBE) suministrado por Bio-Rad, los marcadores de tamaño de DNA fueron suministrados por Roche y el tinte para detectar los ácidos nucleicos utilizado fue GelRed suministrado por Biotium.
- Las inmunoglobulinas (Igs) conjugadas con peroxidasa contra las Igs de conejo y ratón, las Igs humanas biotiniladas y la streptavidina-peroxidasa (Streptavidin-horseradish peroxidase) fueron suministradas por GE Healthcare.

4. Manipulación de células y virus

4.1. Cultivo de células eucariotas

Las células HEp-2 y CV-1 se crecieron en placas Petri con medio DMEM-10 y las células Vero 118 con IMDM-10. Todas las líneas celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 98% de humedad. Las monocapas celulares se subcultivaron desprendiéndolas con tripsina-verseno. Para su almacenamiento, las células se resuspendieron en STF con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) y se congelaron en nitrógeno líquido.

4.2. Cultivo de bacterias

- XL10-Gold: Bacterias utilizadas para la transformación con plásmidos derivados del pRB21 y del pGEX-5x-3. Las bacterias transformadas se seleccionaron en medio Circlegrow semisólido con 100µg/ml de ampicilina y se crecieron en medio LB líquido con ampicilina durante 16-20 horas a 37°C en agitación.
- BL-21: Se utilizaron para la expresión y posterior purificación de péptidos fusionados a Glutación S-Transferasa (GST). Las bacterias BL-21 transformadas con plásmidos pGEX-5X-3 (portadores del gen GST) se crecieron en medio ONE con 100µg/ml de ampicilina. Normalmente, se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación.

4.3. Metaneumovirus humano_GFP (MNVH_gfp_A1 y MNVH_gfp_B1)

A) Crecimiento

Cultivos semiconfluentes de células Vero-118 en placas Petri P150 (13x10⁶ células/placas) se infectaron con 0,1 unidades formadoras de foco por célula (uff/célula) con medio IMDM-0. Después de una hora de adsorción a 37°C se retiró el inóculo y se añadió IMDM-0 fresco. Al día siguiente, se retiró la mitad del medio de la placa y se añadió medio IMDM con 4µg/ml de tripsina y se dejó progresar la infección durante 4-5 días. Cada dos días se retiró el 25% del medio y se agregó medio IMDM-0 fresco con 8µg/ml de tripsina. Cuando el efecto citopático era extensivo, se rasparon las células y se recogieron junto con el sobrenadante, se clarificó y se añadió un 25% de sacarosa para su almacenamiento en nitrógeno líquido hasta su utilización.

B) Titulación por unidades formadoras de foco (uff)

Cultivos confluentes de células Vero-118 (5x10⁴ células/pocillo) en placas de 96 pocillos (M96) se infectaron por duplicado con 50µl/pocillo de diluciones seriadas del stock de virus (previamente incubadas 30 minutos a temperatura ambiente) en medio IMDM-0. El virus se dejó adsorber durante una hora a 37°C. Posteriormente se añadieron 50µl de IMDM-0 con

2µg/ml de tripsina y los cultivos se incubaron durante 48 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo de infección se retiró el sobrenadante y los pocillos se lavaron con PBS. La estimación del título de virus se llevó a cabo mediante el recuento directo al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TS-100 con la unidad Nikon Intensilight C-HGFI acoplada) de focos de infección fluorescentes de un tamaño de 10-15 células. El título, expresado en uff/ml, se calculó a partir de la dilución en la que el recuento (n) fue de ~ 100 focos, según la fórmula: $(n \times 1/\text{Dilución stock}) \times 20$. Los títulos obtenidos fueron de ~ 1×10^5 - 10^6 uff/ml con ambos MNVH_GFP.

C) Ensayo de neutralización de MNVH

Cultivos confluentes de Células Vero-118 en placas M96 se infectaron con 50µl/pocillo de una dilución del virus (multiplicidad de infección de 0.05 uff/célula) que había sido pre-incubado 30 minutos a temperatura ambiente en presencia o ausencia de distintas cantidades de anticuerpos diluidos en medio IMDM-0. Tras dejar un período de una hora de adsorción del virus a 37°C, se añadió 50µl/pocillo de IMDM-0 con 2µg/ml de tripsina. A las 48 horas post-infección se retiró el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con 0,05% de Tween-20 en PBS y una vez con PBS (ambos fríos). Las células se fijaron con acetona al 80% en PBS durante 20 minutos a 4°C. Tras retirar la acetona, los pocillos se secaron y se saturaron con 100µl/pocillo de suero de cerdo (SC) al 5% en 0,05% de Tween-20 en PBS. Seguidamente se cuantificó la cantidad de antígeno viral presente en los pocillos mediante un ELISA con un anticuerpo monoclonal dirigido frente a la proteína F del MNVH (AcM 132) tal y como se describe en el apartado 11.1. En los pocillos de virus control (sin anticuerpo) de todos los ensayos se registraron valores de 2,5-3 unidades de absorbancia a 490nm.

4.4. Virus Respiratorio Sincitial humano (VRSH)

Ensayo de neutralización de VRSH

Células HEp-2 creciendo en placas de 96 pocillos (3×10^4 células/pocillo) se infectaron con 50µl/pocillo del VRSH a una multiplicidad de infección de 0,05 ufp/célula, pre-incubado 30 minutos a temperatura ambiente en presencia o ausencia de distintas cantidades de anticuerpos diluidos en medio DMEM-2,5. Tras dejar un período de una hora de adsorción del virus a 37°C, se añadió 100µl/pocillo de medio DMEM-2,5. A las 72 horas post-infección se retiró el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con 0,05% de Tween-20 en PBS y una vez con PBS (ambos fríos). La fijación de las células con acetona y la saturación de los pocillos se realizó como se describe en el apartado 4.3-C. La cantidad de antígeno viral producido en la monocapa de células infectadas se detectó mediante ELISA con un cóctel de AcMs dirigidos frente a las proteínas F y G del VRSH (2F, 47F, 56F, 021/1G y 021/21G) tal y como se describe

en el apartado 11.1. En los pocillos de virus control (sin anticuerpo) de todos los ensayos se registraron valores de 3-3,5 unidades de absorbancia a 490nm.

4.5. Virus Vaccinia

A) Crecimiento y purificación

Cultivos confluentes de células CV-1 creciendo en placas P150 (13×10^6 células) se infectaron con los virus vaccinia recombinantes a una multiplicidad de infección de 0,1 ufp/célula en DMEM-0. La infección se dejó progresar durante 48-72 horas; transcurrido este tiempo se rasparon las células, se recogieron junto con el sobrenadante y se centrifugaron durante 10 minutos a 2.500 rpm y 4°C. El sedimento se procesó mediante lavado con PBS estéril, resuspensión en 1mM Na_2HPO_4 (3ml/placa p150), 3x ciclos de congelación (-80°C) / descongelación (37°C), sonicación en baño de ultrasonidos durante 1 minuto y clarificación mediante centrifugación durante 10 minutos a 2.500 rpm y 4°. Por último, el sobrenadante resultante se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para purificar los virus mediante colchón de sacarosa, el sobrenadante clarificado se ultracentrifugó a 20.000 rpm durante 1 hora a 4°C en un rotor SW28 a través de un colchón de sacarosa del 45% en 1mM Na_2HPO_4 . El sedimento se resuspendió en 1mM Na_2HPO_4 (800µl) y se guardó a -80°C.

B) Titulación por plaqueo en agar

Monocapas confluentes de células CV-1 crecidas en placas de 6 pocillos (1×10^6 células/pocillo) se infectaron por duplicado con 1ml/pocillo de diluciones seriadas de virus vaccinia en DMEM-2,5. Después de 1 hora de adsorción a 37°C se retiró el inóculo, se lavaron las células con DMEM-2,5 y se añadió DMEM-agar. A las 48 horas post-infección, las células se fijaron con 1 ml de formaldehído al 10% en PBS completo (con Calcio y Magnesio) durante 30 minutos a temperatura ambiente y, una vez retirado el agar, las células se tiñeron con 1ml de 0,1% cristal violeta en 20% metanol durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se procedió al recuento visual de placas de lisis. El título, expresado en ufp/ml, se calculó a partir de la dilución en la que el recuento (n) fue de ~ 50 placas de lisis, según la fórmula: $(n \times 1/\text{Dilución stock})$. Los títulos obtenidos fueron de $\sim 1 \times 10^7$ - 10^8 ufp/ml con todos los virus vaccinia recombinantes.

C) Construcción de virus vaccinia recombinantes

Los virus vaccinia recombinantes empleados en este trabajo se prepararon siguiendo el protocolo de Blasco et al., (Blasco et al., 1995). Células CV-1 creciendo en pocillos de placas M-6 se infectaron con 1ml/pocillo de una dilución del vaccinia de la cepa vRB12 a una

multiplicidad de 0,1 ufp/célula en DMEM-0. Tras 1 hora a 37°C, se retiró el medio, se lavaron las células y se les añadió 1ml/pocillo de DMEM-0. Las células se transfectaron con 100µl de una mezcla que contenía 15µl de Lipofectamina-2.000 (Life technologies) y 5µg del plásmido pRB21 que contenía el gen a expresar. Transcurridas 4-5 horas se retiró el medio, se lavaron las células y se añadió de nuevo 2ml/pocillo de DMEM-0. Como el vRB12 carece del gen VP37 y es, por tanto, incapaz de formar placas de lisis, los virus recombinantes (que sí forman placas) se pudieron recuperar de las células infectadas y transfectadas a las 48 horas de haberse infectado, mediante plaqueo en células CV-1. Las placas de lisis se recuperaron y clonaron por plaqueo 3 veces más para asegurar que el virus recuperado no contenía nada del virus parental.

5. Obtención de sueros policlonales

Para la obtención de sueros policlonales, conejos New Zealand se inocularon utilizando distintos métodos en función del inmunógeno. En todas las inmunizaciones, se siguieron las siguientes pasos:

- Obtención del suero pre-inmune mediante extracción de sangre de la oreja previa a la inoculación.
- Dos inoculaciones con intervalos de 20-30 días.
- Obtención del primer suero inmune mediante extracción de sangre (de la oreja) a las 3-4 semanas después de la segunda inoculación. Extracciones posteriores cada 3-4 semanas.
- Sangría final con punción directa en el corazón.
- Evaluación de la respuesta inmune de los conejos mediante ELISA.

5.1. Sueros policlonales frente a los virus vaccinia recombinantes vv_Fc y vv_F_{TM}

Los conejos se inocularon con 1×10^7 ufp/conejo de los virus vaccinia recombinantes purificados por colchón de sacarosa (como se explica en el apartado 4.5-A) en PBS estéril en un volumen final de 250µl. La inoculación se realizó por vía intramuscular en las patas traseras.

5.2. Sueros policlonales dirigidos frente a GST-RHA-L-RHB

Los conejos se inocularon con 100µg/conejo de la proteína GST-RHA-L-RHB purificada (apartado 8-D). Los 100µg de proteína se llevaron a un volumen final de 450µl en PBS estéril. Esta dilución se mezcló con adyuvante completo de Freund (Difco) (1:1) y se sonicó en frío hasta su emulsión. La inoculación se realizó por vía intradérmica en múltiples sitios del

lomo. A diferencia del resto de inmunizaciones, para este caso no se llevó a cabo una segunda inoculación.

6. Subclonaje del gen que codifica la proteína F del MNVH de la cepa NL/1/00 (sublinaje A1) en el plásmido pRB21

A) Amplificación del DNA

La amplificación del gen que codifica la proteína F se realizó mediante PCR a partir del plásmido pCAGGs_Fc_A1, que tiene clonado el gen completo de la proteína F de la cepa NL/1/00. La mezcla de reacción se preparó con: 5ng de pCAGGs_Fc_A1, 10mM dNTPs, 100ng de los oligonucleótidos A1_EcoRI_1-15+ y A1_NcoI_1602-1620- (Tabla 1) y 2,5 unidades de la enzima Taq-polimerasa (Applied Biosystems) en un volumen final de 50µl del tampón de PCR (10mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl). El programa de PCR utilizado fue de: 1x ciclo de 94°C/2min, seguido de 25x ciclos de 94°C/30seg, 60°C/1min, 72°C/5min y 1x ciclo final de 72°C 10min. La mezcla de reacción se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% en TBE para comprobar que se había producido la amplificación.

B) Digestión y ligación

Tanto el vector de clonaje, pRB21, como el gen amplificado de la proteína F, se digirieron con los enzimas de restricción Eco RI y Nco I siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Roche). Tras la digestión, las muestras se incubaron 20 minutos a 65°C para inactivar las enzimas. A continuación, el pRB21 digerido se trató durante 2 horas a 37°C con fosfatasa alcalina (USB/GE Healthcare) para evitar una posible recircularización. Pasado este tiempo, la enzima se inactivó a 65°C durante 20 minutos. Finalmente, el plásmido y el gen amplificado de la proteína F se ligaron con la enzima T4 DNA ligasa (Rapid DNA Ligation Kit, Roche) durante 30 minutos a temperatura ambiente para obtener el plásmido pRB21_Fc_A1.

C) Transformación de células competentes y selección de bacterias transformadas

Bacterias competentes (XL 10-Gold Ultracompetent Cells, Agilent Technologies) se transformaron con el plásmido resultante siguiendo las indicaciones del proveedor. Las bacterias transformadas se crecieron durante toda la noche a 37°C en placas con medio Circle-Grow con 100µg/ml de ampicilina.

Varias colonias se crecieron en 5ml de medio LB con 100µg/ml de ampicilina durante toda la noche en agitación. La extracción del DNA se realizó con el kit QIAprep spin Miniprep Kit en el Quiacube (Quiagen). Para comprobar que la secuencia clonada en el plásmido era la correcta, el DNA se secuenció en la unidad de Genómica del Centro Nacional

de Microbiología con oligonucleótidos específicos complementarios a regiones internas del gen clonado (Tabla 1).

Para posteriores producciones y purificaciones del plásmido pRB21_Fc_A1, las bacterias portadoras del plásmido se crecieron como se indica en el apartado 4.2 y la extracción del DNA se realizó utilizando el kit S.N.A.P. MidiPrep Kit Solutions (Life technologies) siguiendo las indicaciones del proveedor.

7. Mutagénesis del gen de la proteína F del MNVH (cepas NL/1/00 y NL/1/99) clonado en el plásmido pRB21

Para la obtención de los mutantes en el gen de la proteína F, previamente clonado en el plásmido pRB21 se utilizó el kit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). Los moldes, reacciones y oligonucleótidos utilizados en cada mutagénesis se indican en la Tabla 2. En todos los casos, la mezcla de reacción se preparó con: 100ng del DNA molde, 12,5mM dNTPs, 10µM de los oligonucleótidos y 1 unidad del enzima en un volumen final de 50µl del tampón proporcionado por el Fabricante. El programa de PCR utilizado fue de: 1x ciclo a 98°C/2min, seguido de 30x ciclos a 98°C/30seg, 55°C/30seg y 72°C/4min y 1x ciclo final de 72°C/10min. El producto de la PCR se digirió siguiendo las indicaciones del proveedor con DpnI para eliminar el DNA parental metilado.

En el caso de los mutantes de delección, tras el tratamiento con DpnI se realizó la ligación con la enzima T4 DNA ligasa (Rapid DNA Ligation Kit, Roche) siguiendo las indicaciones del proveedor.

La transformación de bacterias competentes (XL 10-Gold Ultracompetent Cells, Agilent Technologies), la extracción del DNA y la verificación de la secuencia de nucleótidos de los distintos mutantes se hicieron del mismo modo que en el apartado anterior.

Mutante	Molde	Estrategia	Reacción	Oligonucleótidos
pRB21_F _{TM} -_foldon_B1	pRB21_F _{TM} -_6His	Inserción de la secuencia foldon y del sitio de corte por el factor Xa	1	B1_TM-_Foldon + B1_TM-_Foldon - 1
			2	B1_TM-_Foldon + B1_TM-_Foldon - 2
		Inserción del sitio de corte por el enzima TEV	3	F_MNVH_TEV + B1_TEV -
pRB21-F _{TM} -_Δ103-111_KRKRR_foldon_B1	pRB21_F _{TM} -_foldon_B1	Delección aa 103-111	1	B1_Δ103-111 + B1_Δ103-111 -
		Inserción del sitio de corte II VRSH	2	B1_Δ103-111 + B1_KRKRR -
pRB21-F _{TM} -_Δ103-111_KRKRR_foldon_A1	pRB21_Fc_A1	Sustitución del aa G294E	1	A1_G294E + A1_G294E -
		Mutación del aa 490 por un codón de STOP e inserción del sitio de corte por el factor Xa y la cola de 6 His	2	A1_TM-_Xa_6His + A1_TM-_Xa_6His -
		Inserción de la secuencia foldon	3	A1_TM-_Foldon + A1_TM-_Foldon - 1
			4	A1_TM-_Foldon + A1_TM-_Foldon - 2
		Inserción del sitio de corte por el enzima TEV	5	F_MNVH_TEV + A1_TEV -
		Delección aa 103-111	6	A1_Δ103-111 + A1_Δ103-111 -
		Inserción del sitio de corte II VRSH	7	A1_Δ103-111 + A1_KRKRR -

Tabla 2 Mutagénesis dirigida en el gen de la proteína F del MNVH.

8. Clonaje, expresión y purificación de fragmentos de proteína F fusionados a GST

Para la obtención de las proteínas quiméricas GST-RHA-Linker (GST-RHA-L) y GST-RHB fue necesario el clonaje del fragmento RHA (aminoácidos 130-176 de la proteína F) seguido del linker (GSSGGV), y del fragmento RHB (aminoácidos 447-487 de la proteína F) en el sitio de clonaje múltiple del plásmido pGEX-5X-3 que está precedido del gen que codifica la proteína Glutación S-Transferasa (GST). Posteriormente, para la obtención del plásmido pGEX-5X-3 con la construcción RHA-L-RHB (pGEX-5X-3_RHA_L_RHB) se realizó una mutagénesis dirigida sobre el plásmido pGEX-5X-3_RHA_L. Finalmente, para la expresión y posterior purificación de los fragmentos mencionados fusionados a GST (GST-RHA-L, GST-RHB y GST-RHA-L-RHB) fue necesaria la transformación de bacterias *E. coli* BL21 con los plásmidos pGEX-5X-3 obtenidos. Las distintas etapas realizadas se describen a continuación:

A) Clonaje de los fragmentos RHA-L y RHB en el plásmido pGEX-5x-3

Los fragmentos RHA_L (aminoácidos 130-176 seguido del linker GSSGGV) y RHB (aminoácidos 447-487) (ver Figura 12) del gen de la proteína F del MNVH sublinaje A1 se amplificaron mediante PCR a partir del plásmido pRB21_Fc_A1 (plásmido que contiene el gen completo de la proteína F de la cepa NL/1/00) utilizando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 3. La mezcla de reacción se preparó con: 5ng de molde, 10mM dNTPs, 100ng de cada oligonucleótido y 2,5 unidades del enzima Taq-polimerasa (Applied Biosystems) en 50µl del tampón de PCR (10mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂). El programa de PCR utilizado fue de: 1x ciclo de 94°C/2min, seguido de 25x ciclos de 94°C/30seg, 60°C/1min, 72°C/5min y 1x ciclo final de 72°C 10min. Las mezclas de reacción se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% en TBE para comprobar que se había producido la amplificación.

Fragmento	Molde	Oligonucleótidos
RHA_L	pRB21_Fc_A1	A1_Bam_F388-408 + A1_Sal_linker_F505-528 -
RHB	pRB21_Fc_A1	A1_Bam_F1336(T/C)-1356 + A1_Not_F1444-1464

Tabla 3. Amplificación de los fragmentos de las RHA y RHB de la proteína F del MNVH.

Para el clonaje del fragmento RHA_L en el plásmido pGEX-5X-3, ambos se digirieron con los enzimas de restricción Bam HI y Sal I siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Roche), mientras que para el clonaje del fragmento RHB en el pGEX-5X-3 se utilizaron los enzimas de restricción Bam HI y Not I. Tras la digestión, los fragmentos y los

plásmidos se incubaron 20 minutos a 65°C para inactivar los enzimas. A continuación, los plásmidos se trataron durante 2 horas a 37°C con fosfatasa alcalina (USB/GE Healthcare) para evitar una posible recircularización. El enzima se inactivó a 65°C durante 20 minutos. Los plásmido se ligaron con su fragmento correspondiente (RHA_L o RHB) con el enzima T4 DNA ligasa (Rapid DNA Ligation Kit, Roche) durante 30 minutos a temperatura ambiente obteniéndose los plásmidos pGEX-5X-3_RHA_L y pGEX-5X-3_RHB.

Seguidamente, la transformación de bacterias competentes (XL 10-Gold Ultracompetent Cells, Agilent Technologies) y la extracción del DNA se hicieron del mismo modo a lo explicado en el apartado 6-C. Para verificar que la inserción de los fragmentos había sido correcta, el DNA se secuenció con los oligonucleótidos específicos complementarios a regiones adyacentes al sitio de clonaje múltiple del plásmido pGEX-5X-3 (pGEX + y pGEX -, Tabla 1).

B) Mutagénesis dirigida para la obtención del plásmido pGEX-5X-3_RHA_L_RHB

Para la obtención del plásmido pGEX-5X-3 que expresara la proteína GST-RHA-L-RHB (ver Figura 12), se realizó una mutagénesis dirigida sobre el plásmido pGEX-5X-3_RHA_L empleando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 4 y el kit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). La mezcla de reacción estaba compuesta por: 100ng del DNA molde, 12,5mM dNTPs, 10µM de los oligonucleótidos y 1 unidad del enzima en un volumen final de 50µl del tampón proporcionado por el Fabricante. El programa de PCR utilizado fue: 1x ciclo a 98°C/2min, seguido de 30x ciclos a 98°C/30seg, 55°C/30seg y 72°C/4min y 1x ciclo final de 72°C/10min. El producto de la PCR se digirió siguiendo las indicaciones del proveedor con DpnI para eliminar el DNA parental metilado.

Mutante	Molde	Reacción	Oligonucleótidos
pGEX-5X-3_RHA_L_RHB	pGEX-5X-3_RHA_Linkers	1	A1_RHA_L_RHB 1.1 + A1_RHA_L_RHB -
		2	A1_RHA_L_RHB 1.2 + A1_RHA_L_RHB -

Tabla 4. Mutagénesis del plásmido pGEX 5X-3_RHA_Linkers para la obtención del plásmido pGEX-5X-3_RHA_L_RHB.

La transformación de bacterias competentes (XL 10-Gold Ultracompetent Cells, Agilent Technologies) y la extracción del DNA se hicieron del mismo modo que en el apartado 6-C. Para la verificación de la secuencia de nucleótidos del mutante de nuevo se utilizaron los oligonucleótidos pGEX + y pGEX - (Tabla 1).

C) Transformación de bacterias *E. coli* BL21

La expresión de las proteínas GST-RHA-L, GST-RHB y GST-RHA-L-RHB se llevó a cabo en bacterias *E.coli* BL21. Para ello, primeramente bacterias *E.coli* BL21 (Agilent Technologies) se transformaron siguiendo las indicaciones del proveedor con los plásmidos pGEX-5X-3_RHA_L, pGEX-5X-3_RHB, pGEX-5X-3_RHA_L_RHB y con el plásmido pGEX-5X-3 (para la producción de GST). Las bacterias transformadas se crecieron durante toda la noche a 37°C en placas con medio Circle-Grow y 100µg/ml de ampicilina. Varias colonias (de las bacterias transformadas con cada plásmido) se crecieron en 5ml de medio LB con 100µg/ml de ampicilina durante toda la noche en agitación. Finalmente, se realizó la extracción del DNA con el kit QIAprep spin Miniprep Kit en el Quiacube (Quiagen) y posteriormente se comprobó de nuevo mediante secuenciación con los oligonucleótidos pGEX + y pGEX - (Tabla 1) la ausencia de cambios de nucleótidos no deseados en los insertos.

D) Expresión y purificación de fragmentos de proteína F fusionados a GST

Las bacterias *E.coli* BL21 que portaban los plásmidos arriba mencionados se crecieron en 35ml (x2) de medio autoinducible ONE con 100µg/ml de ampicilina durante toda la noche a 37°C en agitación. Transcurrido este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en PBS con 5mM DTT, se sonicó a 4°C con el fin de lisar las bacterias y se centrifugó a 13.000 rpm durante 3 minutos a 4°C para eliminar posibles restos celulares. Para la purificación de las proteínas mediante cromatografía de afinidad, cada fracción soluble se pasó por columnas que contenían la resina Glutathion-Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare). Las columnas se incubaron durante toda la noche a 4°C en movimiento rotatorio y tras lavar la resina con PBS, las proteínas se eluyeron con 50mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM glutatión. El grado de pureza de las proteínas obtenidas se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 14% y posterior tinción con azul de Coomassie como se detalla en el apartado 11.3.

9. Purificación y manipulación de anticuerpos

9.1. Purificación de anticuerpos policlonales mediante cromatografía de afinidad

Los anticuerpos (Acs) policlonales se purificaron a partir de sueros de conejo. El material se diluyó 1:1 en tampón de adsorción (1,5M Glicina, 3M NaCl, pH 8,9) y a continuación se pasó por una columna de proteína A-Sepharosa CL 4B (GE Healthcare) equilibrada en el mismo tampón. Una vez pasado el material, la columna se lavó con PBS y los Acs unidos a la columna se eluyeron con el tampón 0,1M citrato sódico pH 3. El proceso de purificación se siguió midiendo la densidad óptica a 280nm. El pH de la fracción de Acs eluída se neutralizó con Tris saturado y finalmente los Acs purificados se dializaron frente a PBS utilizando casetes

de diálisis con un tamaño de poro de 10KDa (Slide-A-lizer Gamma Irradiated Dialysis Cassette Extra-Strength, Thermo Scientific).

9.2. Preparación de columnas de inmunoafinidad

Las columnas de afinidad se prepararon con la proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_B1}$ o con el monómero de la proteína F del MNVH purificados tal y como se comenta en el apartado 10. Ambas construcciones de proteína F purificadas se acoplaron a una matriz de CNBr-Sepharosa 4B (GE-Healthcare) utilizando una relación 1:100 (masa proteína : masa Sepharosa) según el protocolo indicado por la casa comercial. Para ello, la resina se hidrató con HCl 1mM, se lavó con 1mM HCl y H₂O y se equilibró en el tampón de acoplamiento (0,1M NaHCO₃, 0,5M NaCl, pH 8,3). Las proteínas F dializadas frente al mismo tampón casetes de diálisis con un tamaño de poro de 10KDa de acoplamiento se mezclaron con la resina y las mezclas respectivas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación suave. Seguidamente, los grupos activos de la resina que no habían reaccionado se bloquearon con 0,1M Tris-HCl, pH 8,0 durante 3 horas a temperatura ambiente. Por último, las resinas se lavaron 3 veces de forma alternativa con 0,1M acetato sódico, NaCl 0,5M, pH 4,0 y con 0,1M Tris-HCl, 0,5M NaCl, pH 8,0. Las resinas se empaquetaron manualmente en columnas de cromatografía (Poly-Prep® Chromatography Columns, BIO-RAD) y se guardaron a 4°C en 2% azida en PBS hasta su utilización.

9.3. Purificación de anticuerpos que reconocen a proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_B1}$ y al monómero de proteína F

Las preparaciones de anticuerpos (Acs) se añadieron a las columnas de cromatografía donde estaban empaquetadas la resina de Sheparosa- $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_B1}$ o la resina de Sheparosa-monómero preparadas como se indicó en el apartado anterior. Las resinas con los Acs se incubaron durante toda la noche a 4°C con movimiento rotatorio suave. Transcurrido este tiempo, se recogió el material no retenido en las columnas y se lavaron con PBS hasta que la densidad óptica medida a 280nm del lavado fue menor a 0,03. Seguidamente, los Acs unidos a la proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_B1}$ o al monómero de proteína F se eluyeron con un tampón 0,1M glicina-HCl pH 2,5. Las fracciones eluidas se neutralizaron con Tris saturado.

Los anticuerpos $\alpha-F_{TM_VRSH}$ y α -monómero_VRSH se purificaron siguiendo la misma metodología que la explicada en el párrafo anterior. Las columnas de Sheparosa- F_{TM_VRSH} y Sheparosa-monómero_VRSH fueron cedidas por la Dra. Concepción Palomo Sanz.

10. Expresión y purificación de las proteínas F mutantes con cola de histidinas a partir de virus vaccinia recombinantes

Cultivos de células CV-1 confluentes en placas Petri P150 (13×10^6 células) se infectaron con los virus vaccinia recombinantes a una multiplicidad de 0,1 ufp/célula en DMEM-0. La infección se dejó progresar durante 48-60 horas. Transcurrido el tiempo de infección, se recogió el sobrenadante y se clarificó mediante centrifugación en un rotor JA-10 (Beckman) durante 10 minutos a 10.000 rpm y 4°C. El sobrenadante, suplementado con inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail tablets, complete EDTA-free. Roche), se concentró con un sistema de flujo tangencial Vivaflow 200 (Sartorius) de 50KDa a un volumen final de 30ml (concentración de 50-60 veces el volumen inicial). Posteriormente se equilibró con el tampón 50mM Na_2HPO_4 pH 8,0, 300mM NaCl hasta un volumen final de 100ml y se procedió a la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad por iones (IMAC) seguida de cromatografía de filtración en gel.

Cromatografía de afinidad por iones (IMAC)

Para la cromatografía de iones metálicos (IMAC) se utilizó una resina de agarosa que tenía unida Ni^{2+} (His-Select Nickel Affinity Gel, Sigma) empaquetada manualmente en columnas de cromatografía (KONTES® FLEX-COLUMN® Chromatography Columns, Kimble Chase). La resina se lavó con H_2O y se equilibró con el tampón 50mM Na_2HPO_4 pH 8,0, 300mM NaCl, 10mM imidazol como indica la casa comercial. Siguiendo las indicaciones del proveedor, a la preparación se le añadió imidazol hasta una concentración final de 10 mM. La columna se conectó a una bomba peristáltica y la muestra se cargó en la columna con un flujo de 0,8ml/minuto. Una vez pasada la muestra, la resina se lavó con el tampón 50mM Na_2HPO_4 pH 8,0, 300mM NaCl, 10mM imidazol para eliminar posibles proteínas que se hubieran adherido de forma inespecífica. La elución de las proteínas se hizo con el tampón 50mM Na_2HPO_4 pH 8,0, 300mM NaCl, 250mM imidazol. El seguimiento de la purificación se llevó a cabo mediante la medición de la absorbancia de las fracciones a 280nm. Las fracciones (0,5ml) con las absorbancias más altas se juntaron y se concentraron a un volumen de 0,5ml con un Amicon Ultra-4 centrifugal filters (Millipore, Merck) con un tamaño de poro de 50 KDa.

Cromatografía de filtración en gel

Para la filtración en gel se empleó una columna de Superdex (HiLoad 16/600 Superdex 200pg, GE Healthcare) conectada a un equipo AKTAPrime Plus (GE Healthcare) y equilibradas con el tampón 50mM Na_2HPO_4 pH 8,0, 300mM NaCl. La muestra eluída de la columna de Ni^{2+} y concentrada se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm y 4°C antes de inyectarla en el equipo. La cromatografía se llevó a cabo a un flujo constante de 0,6ml/min en el mismo

tampón de equilibrado. Se recogieron fracciones de 1ml y las seleccionadas en cada caso se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), Western blot, ELISA y/o microscopia electrónica. Las fracciones de cada construcción con propiedades similares se juntaron, se concentraron con dispositivos Amicon de 50KDa a concentraciones de 0.5-1mg/ml, y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

11. Métodos utilizados para el análisis de las proteínas

11.1. ELISA directo

A placas de cloruro de polivinilo de 96 pocillos (Cultek) se les añadió 50µl/pocillo del antígeno diluido en PBS y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Los pocillos se saturaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con 150µl del tampón 2% suero de cerdo (SC)(Life technologies) diluido en 0,05 % de Tween20 en PBS. A continuación, se retiró el líquido de los pocillos y éstos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 50µl/pocillo del anticuerpo de interés diluido en el tampón anteriormente descrito. Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron exhaustivamente con H₂O. Los complejos inmunes se detectaron mediante incubación durante una hora a temperatura ambiente con 50µl de un anticuerpo secundario α-Ig específico de especie conjugado con peroxidasa diluido en el tampón 2% SC en PBS, seguido de 50µl del sustrato comercial OPD (Sigma) diluido en el tampón 0,1M citrato, 0,2M fosfato pH 5,5 y H₂O₂ al 0,06%. La reacción colorimétrica se paró añadiendo H₂SO₄ 3N y la densidad óptica de cada pocillo se midió a 490nm con un dispositivo Infinite M200Pro (Tecan).

Cuando se utilizaron inmunoglobulinas humanas, los complejos inmunes se detectaron mediante incubación durante 1 hora con 50µl de un anticuerpo secundario biotinilado, seguido de una incubación con estreptavidina-peroxidasa (GE Healthcare) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron exhaustivamente con H₂O entre cada una de las incubaciones y posteriormente se añadieron 50µl de OPD como se indicó anteriormente.

11.2. ELISA indirecto

A placas de cloruro de polivinilo de 96 pocillos (Cultek) se les añadió 50µl/pocillo del anticuerpo de captura diluido en PBS y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Los pocillos se saturaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con 150µl del tampón 2% SC diluido en 0,05 % de Tween20 en PBS. A continuación, se retiró el líquido de los pocillos y éstos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 50µl/pocillo de diluciones seriadas de la proteína F_{TM}⁻ diluida en el tampón anteriormente descrito. Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron exhaustivamente con H₂O. Posteriormente, los pocillos se incubaron durante una hora con el anticuerpo α-Histidinas biotinilado (BIO-RAD) diluido en el tampón anterior y se

lavaron con agua. Los complejos inmunes se detectaron con 50µl/pocillo de estreptavidina-peroxidasa diluida en el tampón 2% SC en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y se revelaron con sustrato OPD como se describió en el apartado anterior. La reacción colorimétrica se paró añadiendo H₂SO₄ 3N y la densidad óptica de cada pocillo se midió a 490nm.

11.3. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección de proteínas (Western Blot)

Las proteínas diluidas en el tampón de muestra (0,08M Tris-HCl pH 8,8, 2% SDS, 10% glicerol, 0,01% azul de bromofenol), se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7, 10 ó 14% dependiendo del ensayo en presencia de 100mM DTT. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos antes de cargarlas en el gel. El tampón utilizado en la electroforesis fue 25mM Tris, 192mM glicina y 0,1% SDS.

El gel se tiñó durante 1 hora con 0,05% azul de Coomassie, 45% metanol, 7% ácido acético en H₂O. El exceso de colorante se eliminó con 25% metanol, 7% ácido acético en H₂O. Otro colorante utilizado para la tinción de los geles fue BlueSafe (nzytech), y el exceso del mismo se eliminó con H₂O.

Cuando el gel se utilizó para hacer un western blot se electrotransfirió a papel inobilon-P (Millipore, Merck) en tampón de transferencia (25mM Tris, 192mM glicina, 0,1% SDS y 20% metanol) durante 2 horas a 250mA. Los sitios de unión inespecífica de la membrana se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C con 2% agente bloqueante (Membrane blocking agent, GE Healthcare) en 0,01% Tween20 en PBS. Seguidamente, la membrana se incubó en agitación durante una hora a temperatura ambiente con los anticuerpos o sueros diluidos en la solución de bloqueo. A continuación, la membrana se lavó (3 veces) en agitación durante 5 minutos con 0,1% Tween20 en PBS. Los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron mediante la incubación con α-Ig específico de especie conjugado con peroxidasa y, tras lavar de nuevo la membrana con 0,1% Tween20 en PBS, se reveló con el sustrato luminiscente ECL (ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las bandas se visualizaron utilizando un sistema de Kodak (Kodak Gel Logic 1500 Imaging System camera) con el software Kodak Imagen Molecular.

11.4. Detección del estado oligomérico de las proteínas mediante entrecruzamiento con glutaraldehído

Una cantidad de 3µg de las proteínas se diluyeron en H₂O en un volumen final de 40µl. Se añadió 0,1% de glutaraldehído y se incubó durante 10 minutos a temperatura

ambiente. La reacción se paró con glicina 0,2M y el grado de entrecruzamiento se evaluó mediante SDS-PAGE en un gel del 7% como se describe en el apartado anterior, en comparación con marcadores de masa molecular adecuados.

11.5. Microscopía electrónica

Sobre una gota ($\pm 5\mu\text{l}$) de la muestra en estudio se depositó una rejilla de cobre recubierta con carbón (CF300-Cu, EMS) que previamente había sido ionizada mediante descarga iónica (Q150T ES, Quorum). La rejilla fue incubada durante 3-5 minutos con la muestra, se lavó 2 veces en H_2O y se tiñó 10 minutos sobre una gota de formiato de uranilo al 1% (peso/volumen). El exceso de líquido se eliminó mediante contacto del borde de la rejilla con papel de filtro grado 1 (Whatman). Para la visualización de las muestras se empleó, según el caso, un microscopio electrónico FEI Tecnai 12 (estabilizado a 120 kV) o un microscopio Jeol JEM-1011 (estabilizado a 100 kV). Las imágenes fueron registradas en cámaras CCD Gatan ES1000W Erlangshen o Gatan 1k a unas magnificaciones nominal sobre el detector de 20,400X y 30,000X, respectivamente. El trabajo de microscopía electrónica fue llevado a cabo por la Unidad de Microscopía del Centro Nacional de Microbiología.

11.6. Tratamiento de la proteína F_{TM}-foldon_B1 con Tripsina-Agarosa

Una cantidad de 4 μg de la proteína F_{TM}-foldon_B1 se incubó durante 1 hora a 37°C con distintas cantidades de tripsina-agarosa (Trypsin-Agarose T4019-100UN, Sigma) en un volumen final de 40 μl del tampón 300mM NaCl, 50mM Na_2HPO_4 pH 8,0. Transcurrida la hora de incubación, la resina se eliminó por sedimentación tras centrifugaron de las muestras a 13.000 rpm durante 3 minutos. El grado de procesamiento de las proteínas presentes en el sobrenadante se analizó mediante SDS-PAGE en un gel del 10% de acrilamida teñido con azul de Coomassie como se indica en el apartado 11.3.

12. Obtención de Anticuerpos monoclonales α -6HB

Las inmunizaciones de los ratones BALB/c con la proteína GST-RHA-L-RHB y el posterior cribado de los hibridomas se realizó en colaboración con el doctorando Eduardo Olmedillas siguiendo protocolos ya establecidas en el laboratorio.

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. Generación de anticuerpos dirigidos frente a las seis α -hélices de la proteína F del MNVH

Uno de los objetivos de este trabajo era la obtención de una forma soluble de la proteína F del MNVH en su conformación post-fusión. Con el fin de disponer de reactivos específicos de esta conformación se siguió una estrategia utilizada ya en el laboratorio para el caso del VRSH, basada en la obtención de anticuerpos específicos del motivo de seis α -hélices, característico de la conformación post-fusión de las proteínas F de los paramixovirus (Palomo et al., 2014). Para ello, a partir del plásmido pRB21_Fc_A1 se amplificaron los DNAs codificantes de las regiones RHA (aa 130-176 seguido del linker GSSGV, RHA-L) y RHB (aa 447-488, RHB) de la proteína F de la cepa NL/1/00 del MNVH (sublinaje A1). Estos cDNAs se clonaron en el plásmido pGEX-5X-3 a continuación del gen de la proteína Glutacion S-Transferasa (GST), dando lugar a las construcciones GST-RHA-L y GST-RHB de la Figura 12-A.

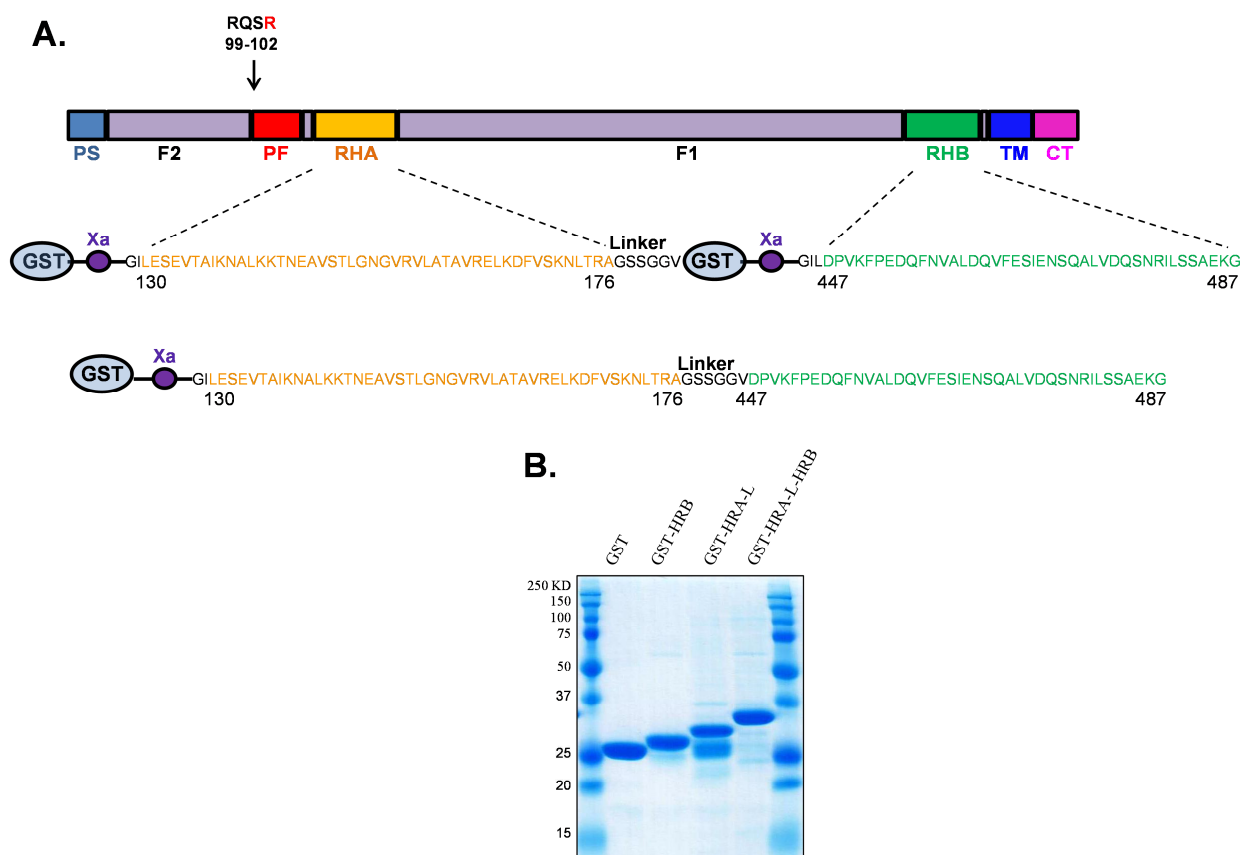


Figura 12. Esquema de las regiones RHA y RHB de la proteína F del MNVH fusionadas a GST y análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas purificadas. A. Representación esquemática de la estructura primaria de la proteína F del MNVH con sus distintos motivos estructurales: **PS**: péptido señal; **F2**: cadena F2; **PF**: péptido de fusión; **RHA**: región heptádica A; **F1**: cadena F1; **RHB**: región heptádica B; **TM**: región transmembrana y **CT**: cola citoplasmática. Las secuencias RHA y RHB que se fusionaron a GST se indican debajo. La RHA está seguida de un linker incluido en uno de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación del DNA. El último diagrama muestra las dos regiones heptádicas unidas por el linker que a su vez están fusionadas a GST. B. SDS-PAGE (14% de acrilamida) de las proteínas purificadas teñido con azul de Coomassie.

La construcción RHA-L-RHB se obtuvo fusionando la secuencia RHB al plásmido pGEX-5X-3_RHA-L como se indica en el apartado 8-D. Debido a la estrategia de clonaje utilizada, la secuencia de reconocimiento del factor Xa y el tripéptido GIL quedaron insertados entre la GST y las regiones heptádicas (en el caso de la RHA, L es el primer aa de esta región heptádica).

Las proteínas GST fusionadas se expresaron en bacterias *E.coli* BL21 crecidas en medio autoinducible ONE y se purificaron mediante cromatografía de afinidad con columnas de Glutathion-Sepharose 4 Fast Flow. En la Figura 12-B se muestra el análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Como se ve, tanto la GST-RHB como la GST-RHA-L-RHB tenían una única banda del tamaño esperado para cada una de estas proteínas. Sin embargo, en el carril donde se analizó la proteína GST-RHA-L se observa una banda del tamaño esperado para dicha proteína y una banda de mayor movilidad electroforética que comigra con la GST. Esta proteína se generó probablemente por un corte espontáneo en el sitio Xa durante la purificación de la proteína GST-RHA-L.

Conejos New Zealand se inmunizaron con la proteína GST-RHA-L-RHB y los anticuerpos (Acs) inducidos se analizaron mediante ELISA frente al propio inmunógeno y frente a las construcciones GST-RHA-L, GST-RHB y GST. Puesto que los sueros de los dos conejos dieron resultados similares, solo se presentan los resultados obtenidos con uno de los sueros. En la Figura 13-A se observa que los Acs inducidos tras la inmunización reconocían tanto a la GST como al resto de proteínas quiméricas. Para enriquecer el suero de Acs que reconocieran específicamente las seis α -hélices, el suero α -GST-RHA-L-RHB se pasó sucesivamente por una columna de Sepharosa que tenía acoplada covalentemente la construcción GST-RHA-L y seguidamente por otra columna de Sepharosa que tenía unida la construcción GST-RHB (Figura 13-B). Los Acs que no se unieron a las columnas de Sepharosa (denominados tentativamente α -6HB), se probaron en ELISA con los mismos antígenos que se utilizaron en el ELISA anterior observándose que habían perdido la reactividad con la GST y con las construcciones GST-RHA-L y GST-RHB, pero mantenían la reactividad con la GST-RHA-L-RHB (Figura 13-C).

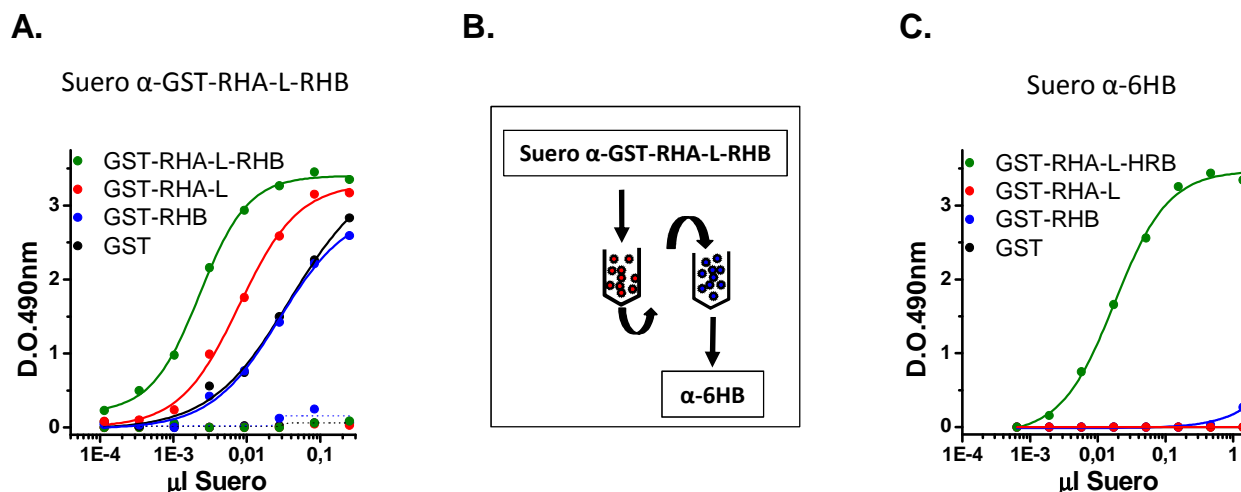


Figura 13. Reactividad del suero α -GST-RHA-L-RHB frente a las distintas construcciones de las regiones heptádicas fusionadas a GST. A. Diluciones seriadas del suero de uno los conejos, inmunizado con GST-RHA-L-RHB se ensayaron en ELISA frente a 0.3 μ g de cada una de las proteínas indicadas. En líneas discontinuas se representa el suero pre-inmune del conejo frente a los mismos antígenos. **B.** Esquema del método utilizado para el enriquecimiento del suero en anticuerpos α -GST-RHA-L-RHB: el suero se pasó primero por una columna de Sepharosa que tenía unida la proteína GST-RHA-L (bolas rojas) y el material que no se unió a la columna se pasó por otra columna de Sepharosa que tenía unida la proteína GST-RHB (bolas azules) obteniéndose entonces un suero llamado tentativamente α -6HB. **C.** El suero α -6HB se ensayó de nuevo en ELISA frente a las construcciones indicadas.

Estos resultados demuestran que los Acs α -6HB reconocen una estructura presente en la construcción GST-RHA-L-RHB que no está representada en ninguna de las otras dos construcciones que contienen las regiones heptádicas separadas. La explicación más probable es que, en la proteína GST-RHA-L-RHB, las dos regiones heptádicas se estructuran de forma similar a como lo hacen en la proteína post-fusión y que los Acs α -6HB dependen de esa estructura para unirse a esa construcción quimérica.

Una vez comprobado que la proteína GST-RHA-L-RHB puede inducir Acs α -6HB se procedió, como en el caso de proteínas análogas del VRSH, a la obtención de anticuerpos monoclonales (AcMs) murinos que reconociesen esta proteína y no a las proteínas GST-RHA-L o GST-RHB. Para ello ratones BALB/c se inmunizaron con la proteína GST-RHA-L-RHB, de cuyos esplenocitos se obtuvieron hibridomas que se ensayaron para la producción de Acs que reconocieran específicamente a esta proteína. La Figura 14 muestra la reactividad específica en ELISA de tres de estos AcMs con la proteína GST-RHA-L-RHB. Mientras que ninguno de los AcMs reconoció a las proteínas GST, GST-RHA-L o GST-RHB, los tres AcMs reconocieron a la GST-RHA-L-RHB.

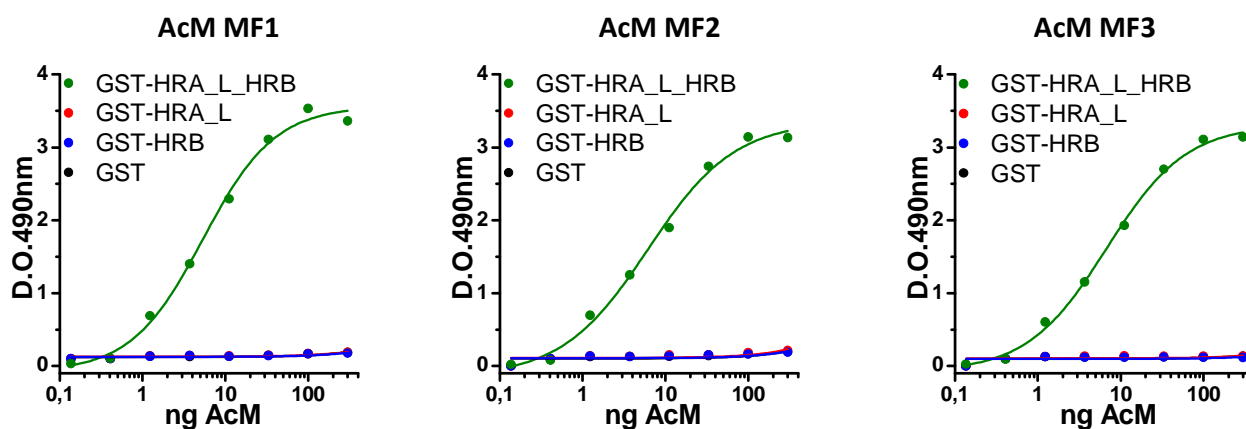


Figura 14. Reactividad de los AcM MF1, MF2 y MF3 frente a las distintas construcciones de las regiones heptádicas fusionadas a GST. Diluciones seriadas de cada uno de los AcMs obtenidos a partir de ratones BALB/c inmunizados con GST-RHA-L-RHB se ensayaron en ELISA frente a 0.3 μ g de cada una de las construcciones indicadas.

Tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales descritos en este apartado se han utilizado rutinariamente en este trabajo como reactivos específicos de la proteína F del MNVH en la conformación post-fusión.

2. Expresión y purificación de formas solubles de la proteína F del MNVH

Siguiendo una estrategia análoga a la que se había utilizado previamente en el laboratorio para obtener una forma soluble de la proteína F del VRSH en la conformación post-fusión, Lorena Ver (2008) había clonado el gen de la proteína F del MNVH (cepa NL/1/99, sublinaje B1), en el plásmido pRB21. Esa proteína se había modificado mediante la introducción de un codón de terminación en el aa 490 para eliminar la región transmembranal y la cola citoplasmática (F_{TM}-B1) (Figura 15-A). Previo al codón de terminación se había introducido una cola de seis His para permitir su purificación mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC). Esta nueva construcción se utilizó por Lorena Ver para la obtención de un virus vaccinia recombinante (vv_F_{TM}-B1) por el método de Blasco y Moss (Blasco et al., 1995). El análisis por microscopía electrónica de la proteína F_{TM}-B1 purificada a partir del sobrenadante de la células HEp-2 infectadas con el vv_F_{TM}-B1 reveló la presencia de moléculas de proteína en forma de conos que eran compatibles con la conformación post-fusión de la misma. Sin embargo, el rendimiento que se obtenía era muy bajo comparado con la proteína equivalente del VRSH.

El primer abordaje que se hizo en este trabajo para intentar aumentar el rendimiento en la obtención de trímero soluble de la proteína F del MNVH en la conformación post-fusión fue modificar algunos detalles de los procesos de producción y purificación de la proteína F_{TM}_B1. Así, células CV-1 se infectaron con el virus vv_F_{TM}_B1 y el sobrenadante se recogió transcurridas 60 horas. Tras eliminar restos celulares, el sobrenadante se concentró unas 50-60 veces y se intercambiò con el tampòn 50mM Na₂HPO₄ pH 8,0, 300mM NaCl, 10mM imidazol. La proteína se purificò mediante IMAC (columnas de Ni²⁺) y se concentrò a un volumen de 500µl. Seguidamente la proteína se sometió a cromatografía de filtración en gel (HiLoad 16/60 Superdex 200pg, GE Healthcare) (Figura 15-B y C), observándose cuatro picos minoritarios y uno mayoritario. El pico eluido en el volúmen donde se esperaba el trímero de proteína (~ 63ml) fue extremadamente bajo. En cambio, el pico mayoritario eluyó en un volumen compatible con el tamaño del monómero de proteína F soluble (~ 77ml). Todos los picos se analizaron por western blot con un suero policlonal α-F y en todos ellos se observó una banda que reaccionaba con el suero α-F de un tamaño aproximado al del precursor no cortado de la proteína F (Figura 15-D).

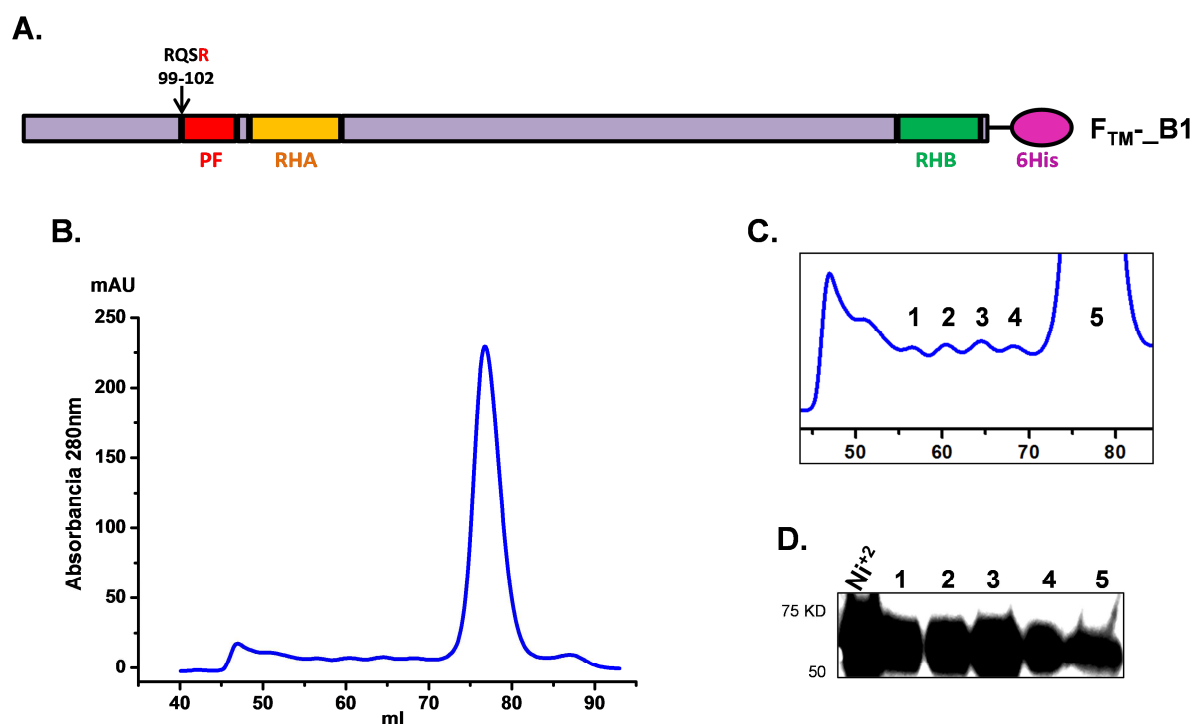


Figura 15. Purificación de la proteína F_{TM}-B1 soluble. **A.** Diagrama del ectodominio de la proteína F_{TM}-B1, tal como se mostró en la Figura 1 pero sin el péptido señal, la región transmembrana ni la cola citoplasmática y con la cola de 6His añadida **B.** Cromatograma de la filtración en gel. **C.** Ampliación del cromatograma mostrado en el panel B, indicando los picos eluidos. **D.** Western blot de la proteína purificada mediante IMAC (Ni²⁺) y de cada de uno de los picos de la filtración en gel, revelado con un suero policlonal α-F.

Una muestra de los picos 3 y 5 se analizó mediante microscopía electrónica (ME) (Figura 16-A). En la muestra del pico 3 (~ 63ml) se observaron moléculas de proteína en forma de conos individuales, que se asemejaban a las descritas para la proteína F soluble del VRSH en la conformación post-fusión (Calder et al., 2000). En el pico 5 (~ 77ml) se observó un material granulado y disperso, sin ninguna forma específica. Estos resultados sugerían que el pico 3 contenía el trímero de proteína F en la forma post-fusión, mientras que el pico 5 contenía el monómero de la proteína F_{TM}_B1, demasiado pequeño para observarse al ME. Para confirmar esta hipótesis, el material de estos dos picos se analizó de nuevo por SDS-PAGE antes y después de entrecruzamiento con glutaraldehído. Como se observa en la Figura 16-B, la proteína del pico 3 se entrecruzó por el glutaraldehído, migrando entonces como un trímero de alto peso molecular, mientras que la proteína del pico 5 no cambiaba su posición en el gel después del tratamiento con glutaraldehído, indicando que efectivamente era un monómero.

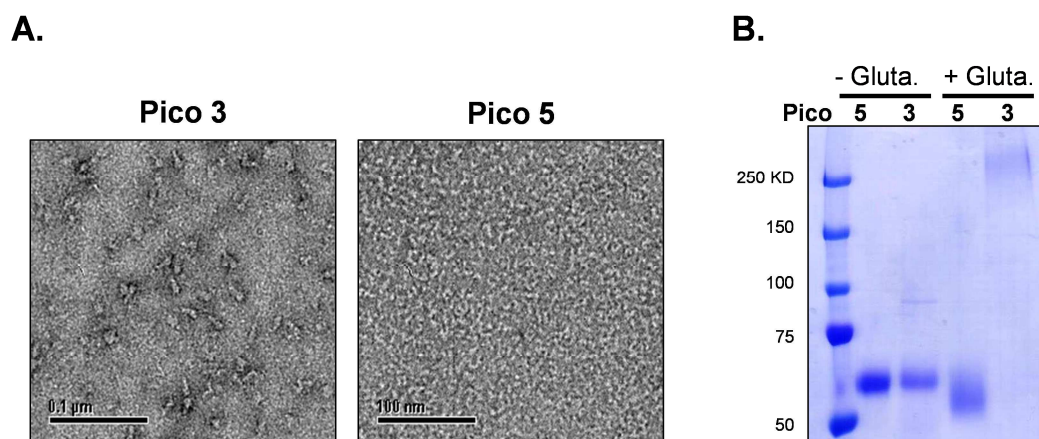


Figura 16. Análisis de las fracciones proteicas obtenidas de la proteína F_{TM}_B1. A. Imágenes de ME obtenidas por tinción negativa de las proteínas eluidas en los picos 3 y 5. **B.** SDS-PAGE (7% de acrilamida) de las mismas proteínas tratadas o sin tratar previamente con glutaraldehído (-/+ Gluta).

Por tanto, aunque se observó la presencia de proteína F en el pico 3 que tenía las propiedades y forma esperables de un trímero de proteína F en la conformación post-fusión, su rendimiento era extremadamente bajo (~ 50μg/litro de sobrenadante) para poder abordar estudios estructurales de la misma, mientras que la mayor parte de la proteína F se eluía como monómero de la columna de filtración en gel. Por tanto, los cambios introducidos en los procesos de producción y purificación no aumentaron el rendimiento en la producción de proteína F trimérica soluble.

2.1. Optimización del rendimiento en la producción de proteína F trimérica soluble de la cepa NL/1/99 (sublinaje B1) en la conformación post-fusión

Una de las estrategias más comunes para la estabilización de proteínas triméricas es fusionarlas al dominio de trimerización “foldon” de la proteína fibritina del bacteriófago T4 (Bhardwaj et al., 2008). Por ello, se hizo una nueva construcción en la que la secuencia codificante del dominio foldon se añadió al extremo C-terminal de la proteína F_{TM_B1} , precedido de la secuencia de corte por la endoproteasa TEV y seguido de la secuencia de corte del factor Xa y la cola de seis His, como se muestra en la Figura 17-A. A partir de este plásmido se obtuvo el virus vaccina recombinante vv_ $F_{TM_foldon_B1}$ y se procedió a la producción y posterior purificación de la proteína correspondiente mediante IMAC (Ni^{2+}) seguida de una cromatografía de filtración en gel. En el cromatograma obtenido (Figura 17-B) se observaron dos picos mayoritarios, uno que eluía a los ~ 60ml, que se llamó pico 1 y otro algo menor que eluía a los ~ 75ml y que se denominó pico 2. Para verificar la identidad de las proteínas de ambos picos, se analizaron mediante SDS-PAGE, antes o después del entrecruzamiento con glutaraldehído (Figura 17-C) y mediante western blot con el suero α -F. El pico 1 (~ 60ml) tenía una sola banda en el SDS-PAGE del tamaño esperado para el precursor no cortado de proteína F mientras que tras su tratamiento con glutaraldehído, migró a una altura compatible con el tamaño de un trímero de proteína F. En cambio, la proteína del pico 2 (~ 75ml) migraba en SDS-PAGE ligeramente retrasada respecto al precursor no cortado de proteína F y no cambió su movilidad tras el entrecruzamiento con glutaraldehído. El western blot reveló que mientras la proteína del pico 1 era reconocida por el suero α -F, estos anticuerpos no reaccionaron con la proteína del pico 2, por lo que probablemente la proteína de este pico sea un contaminante de tamaño similar al del monómero de la proteína F soluble (Figura 17-D).

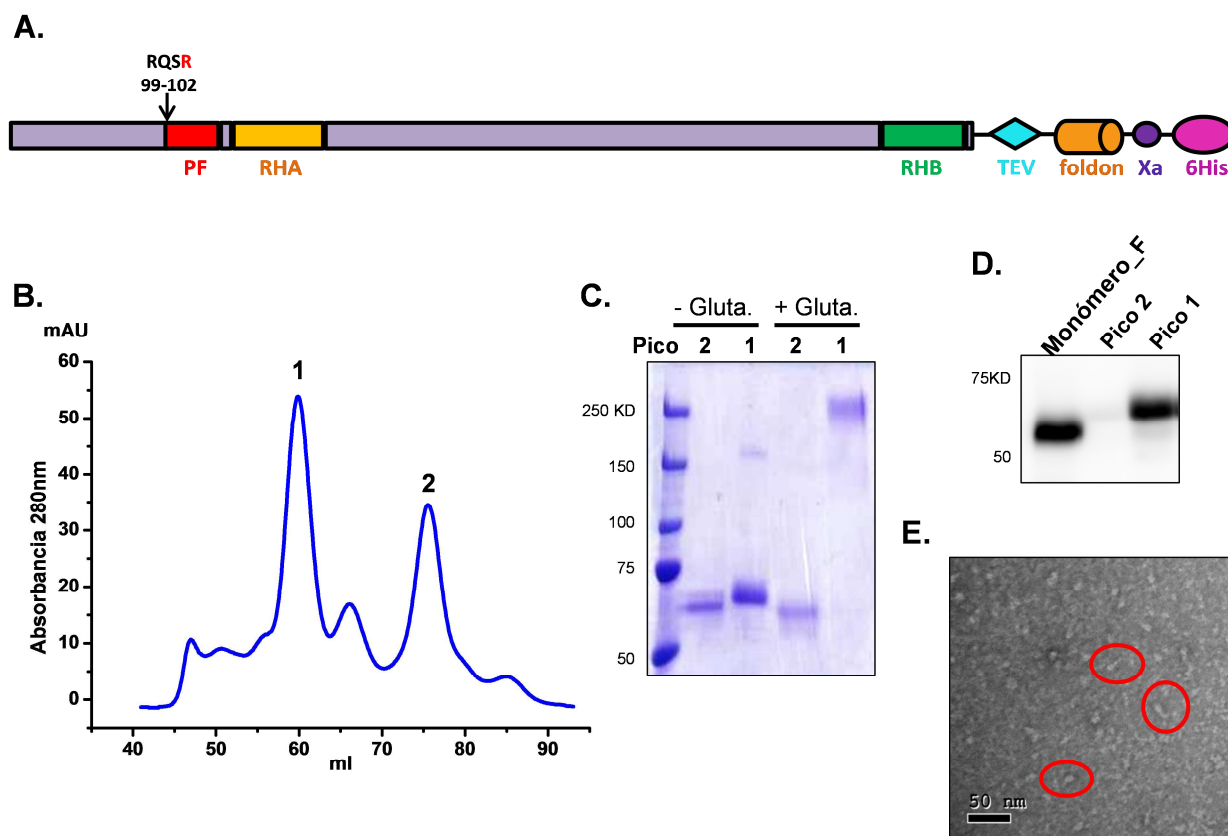


Figura 17. Purificación de la proteína F_{TM}-foldon_B1 soluble. **A.** Diagrama del ectodominio de la proteína F_{TM}-foldon_B1: TEV: sitio de corte del enzima TEV. Foldon: dominio de trimerización. Xa: sitio de corte del factor Xa. **B.** Cromatograma de la filtración en gel. **C.** Entrecruzamiento con glutaraldehído (Gluta: -/+) de las proteínas de los picos 1 y 2 comprobado mediante SDS-PAGE (7% de acrilamida) teñido con azul de Coomassie. **D.** Western blot de las proteínas eluidas en los picos 1 y 2 revelado con un suero policlonal α-F; como control se incluyó el monómero de la proteína F_{TM}-B1 (obtenido en el apartado 2). **E.** Imagen por tinción negativa de ME de la proteína eluída en el pico 1. Los óvalos resaltan algunas moléculas intactas de proteína F_{TM}-foldon_B1 con forma de conos.

Una muestra de la proteína del pico 1 (~ 60ml) se examinó al ME (Figura 17-E) observándose alguna molécula individual de proteína F en forma de cono, indicativo de la conformación post-fusión, pero la mayor parte del material era heterogéneo y sin forma definida. Estos resultados, por tanto, sugerían que el rendimiento en la producción de proteína F_{TM}-foldon_B1 trimérica, que eluía en el pico 1 de la columna de filtración gel (Figura 17) había aumentado considerablemente, comparado con la proteína F_{TM}-B1 (Figura 15). Sin embargo, la proteína F_{TM}-foldon_B1 trimérica así obtenida no era suficientemente estable para poder observarla al ME.

Para comprobar si la estabilidad de la proteína F_{TM}-foldon_B1 aumentaba tras el procesamiento proteolítico en su sitio de corte natural (RQSR, residuos 99-102), una cantidad fija de esa proteína (4µg) se incubó con cantidades crecientes de Tripsina-agarosa durante una hora a 37°C. El grado de procesamiento proteolítico se comprobó mediante SDS-PAGE (Figura 18-A), observándose que la banda correspondiente a la proteína sin procesar (F0) disminuía a medida que aumentaba la cantidad de tripsina mientras que aumentaba la proporción de una

banda del tamaño esperado para la subunidad F1 (50 KDa) y otra banda de menor tamaño (40 KDa) que probablemente fuera el resultado de un procesamiento proteolítico interno de la subunidad F1.

Muestras de la proteína F_{TM}-foldon_B1 tratada con las distintas cantidades de tripsina-agarosa se observaron al ME (Figura 18-B). En la muestra sin tratar se vio de nuevo alguna molécula individual de proteína F en forma de cono, correspondiente a la conformación post-fusión, pero la mayor parte de la imagen estaba formada por un material amorfo como el de la Figura 17-E. A medida que se aumentó la cantidad de tripsina-agarosa, el material amorfo fue disminuyendo y empezaron a aparecer rosetas con espículas de proteína F en su conformación post-fusión unidas entre sí por la parte final del tallo de las mismas.

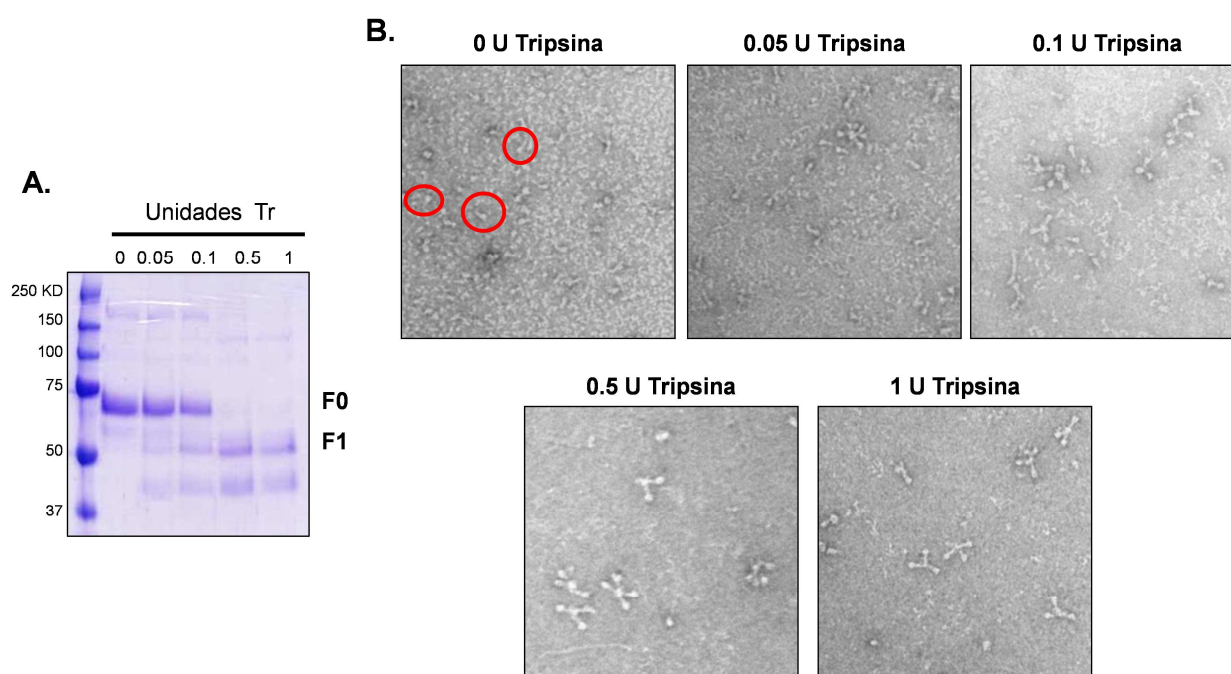


Figura 18. Digestión de la proteína F_{TM}-foldon_B1 con Tripsina-agarosa. A. Una cantidad fija de proteína F (4µg) se incubó con cantidades crecientes de Tripsina-agarosa durante 1 hora a 37°C. Tras la digestión, la proteína se visualizó mediante SDS-PAGE (10% de acrilamida) y se tiñó con azul de Coomassie; Tr, tripsina. B. Imágenes por tinción negativa de ME de cada una de las muestras tratadas con las unidades (U) de Tripsina que se indican.

En resumen, la adición del foldon al ectodominio de la proteína F aumentó considerablemente el rendimiento del trímero de proteína F soluble (0,4mg/litro de sobrenadante) pero este no era lo suficientemente estable para su visualización al ME (Figura 6). Sin embargo, cuando esas mismas moléculas se cortaron con tripsina se observó la aparición de moléculas de proteína F, aparentemente en su conformación post-fusión pero que estaban agregadas en rosetas probablemente como consecuencia de la exposición de los

péptidos de fusión tras el corte proteolítico, como se describió en el caso de la proteína F_{TM}- del VRSH (Calder et al., 2000).

Para evitar la agregación en rosetas del trímero de la proteína F soluble, se diseñó un nuevo mutante de la proteína F_{TM}- del MNVH con dos cambios respecto a la construcción F_{TM}-foldon_B1:

- Sustitución del sitio de corte de la proteína F del MNVH, RQSR (residuos 99-102) por el sitio de corte II de la F del VRSH, KKRKRR para favorecer el procesamiento espontáneo de la proteína por enzimas celulares tipo furina y prescindir así del uso de tripsina.
- Deleción de los primeros 9 aminoácidos del péptido de fusión (Δ 103-111) para evitar la agregación en rosetas.

Una vez obtenido el virus vaccinia recombinante que expresaba la nueva proteína denominada F_{TM}- Δ 103-111_KKRKRR_B1, se llevó a cabo la producción y purificación de la misma mediante IMAC (Ni²⁺), seguida de una cromatografía de filtración en gel. El cromatograma obtenido reveló un aumento notable del pico de proteína que eluía a los ~ 62ml, desapareciendo prácticamente cualquier otro pico del cromatograma (Figura 19-B). Como en los casos anteriores se realizó un entrecruzamiento con glutaraldehído de la proteína del pico mayoritario (~ 62ml) que se visualizó mediante SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie o mediante western blot con el suero policlonal α -F (Figura 19-C). En la muestra sin glutaraldehído se observó que no toda la proteína estaba procesada: más o menos una proporción 2:1 de proteína estaba sin procesar (F0) frente a la proteína procesada (subunidad F1). Es de resaltar que en este y otros geles que se muestran en esta Tesis no se observa la subunidad F2; es consecuencia del porcentaje de acrilamida de los geles que se utilizaron rutinariamente (7 ó 10%) ya que la F2 es de pequeño tamaño y se sale de los mismos. Esta proporción entre la proteína cortada y no cortada fue repetitiva en todas las producciones que se hicieron de esta proteína. Además, se observó que la proteína tratada con glutaraldehído migraba como un trímero de proteína F.

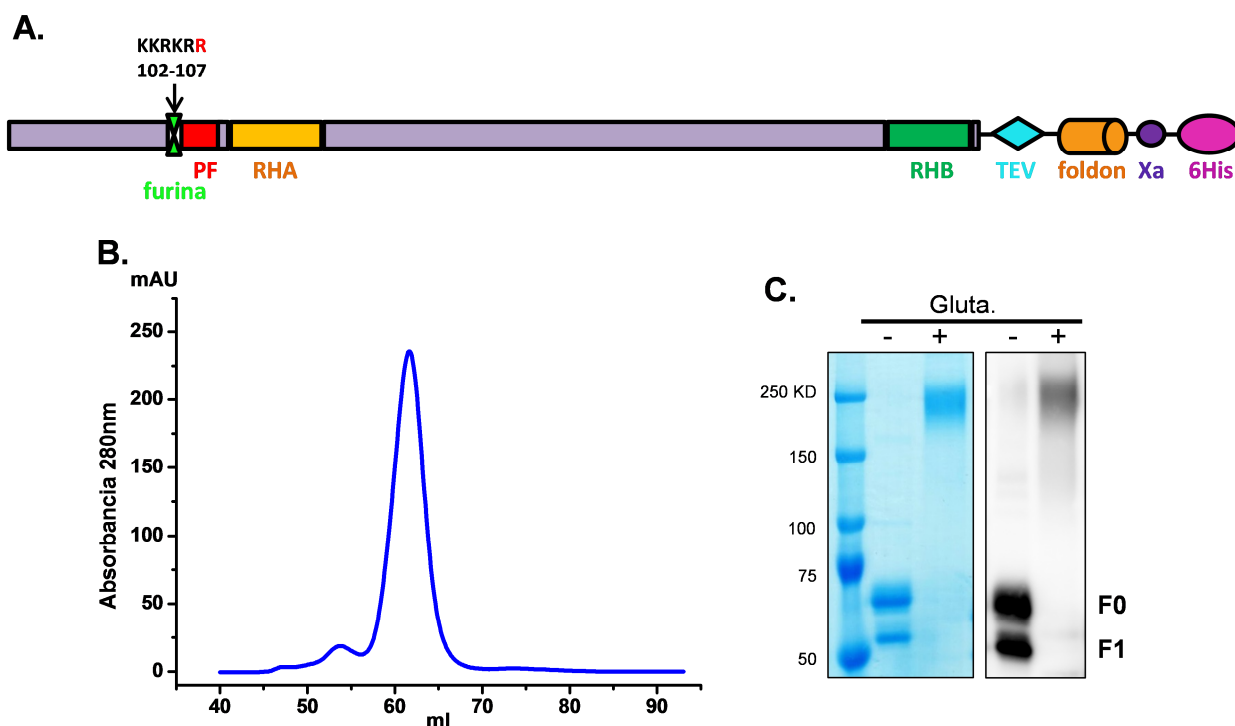


Figura 19. Purificación de la proteína F_{TM}-Δ103-111_KKRKRR_B1 soluble. **A.** Diagrama del ectodominio de la proteína F_{TM}-Δ103-111_KKRKRR_B1. KKRKRR: sitio de corte del enzima furina **B.** Cromatograma de la filtración en gel. **C.** SDS-PAGE (7% de acrilamida) teñido con azul de Coomassie (panel izquierdo) y western blot revelado con un suero policlonal α-F (panel derecho) del material eluido a los 62ml, antes (-) o después (+) del tratamiento con glutaraldehído.

La reactividad de esta nueva construcción de proteína F_{TM}-Δ103-111_KKRKRR_B1 trimérica con los tres AcMs α-6HB descritos en el apartado 1 (MF1, MF2 y MF3) se confirmó por ELISA (Figura 20-A), mientras que el monómero de proteína F (apartado 2), proveniente de purificaciones anteriores (Figura 20-B) no fue reconocido por ninguno de los tres AcMs en el mismo ensayo. Además, la proteína del pico eluido a los 62ml de la Figura 19 se examinó al ME (Figura 20-B), observándose moléculas individuales de proteína en forma de conos, indicativos de que la proteína trimérica F_{TM}-Δ103-111_KKRKRR_B1 había adoptado una conformación post-fusión suficientemente estable para poder visualizarse al ME. Por otro lado, se observaron inmunocomplejos de los AcMs MF1, MF2 y MF3 con la proteína F_{TM}-Δ103-111_KKRKRR_B1 al ME poniendo de manifiesto que los AcMs se unen a la parte final del tallo donde se encuentra localizado el dominio de 6HB. Además, el rendimiento de trímero de proteína F soluble a partir de esta nueva construcción aumentó considerablemente, como se puede estimar del cromatograma mostrado en la Figura 19 (0,6mg/litro de sobrenadante).

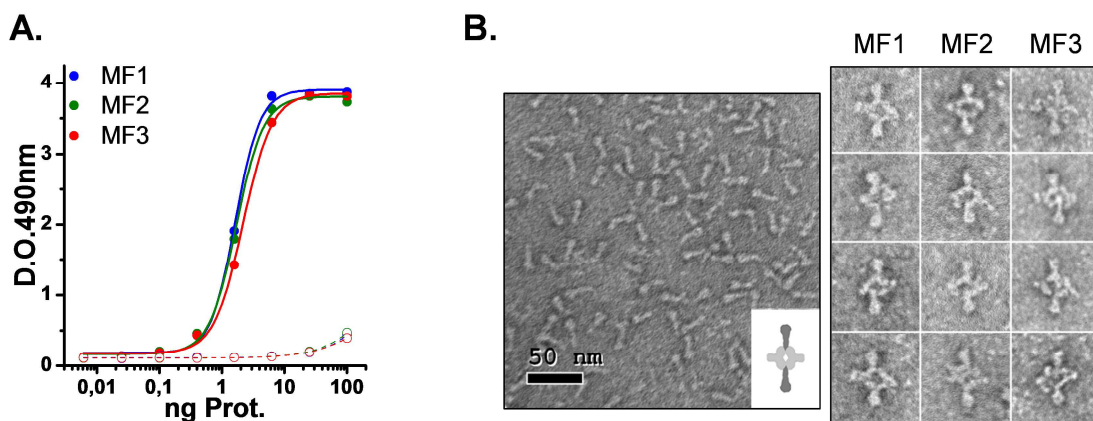


Figura 20. Reactividad de la proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_B1}$ con los AcMs α -6HB en un ELISA indirecto y ME de la misma proteína sola o formando inmunocomplejos con los AcMs α -6HB. **A.** 400ng de cada uno de los AcMs se utilizaron como anticuerpos de captura frente a diluciones seriadas de la proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_B1}$ (círculos rellenos) y del monómero de proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_B1}$ de la Figura 4-B (círculos vacíos). El anticuerpo secundario utilizado fue un α -His. **B.** Tinción negativa observada al ME del trímero de proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_B1}$ purificada. Se muestran imágenes de la proteína F sola o formando inmunocomplejos con los AcMs α -6HB. Se muestra un esquema de cómo se unen dos Acs a dos moléculas de proteína F.

Para obtener una proteína F totalmente cortada y con ello una muestra más homogénea de la misma, células CV-1 se coinfectaron con $vv_{F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_B1}}$ y con un virus vaccinia recombinante que expresa la proteasa furina (Vey et al., 1994). De esta manera se pretendía que el procesamiento proteolítico del precursor de la proteína F fuese más efectivo. La proteína F del sobrenadante de las células doblemente infectadas se purificó como siempre mediante IMAC (Ni^{2+}) y cromatografía de filtración en gel. El cromatograma de la filtración en gel fue superponible al de la Figura 19-B (dato no mostrado). De nuevo, la proteína del pico mayoritario se analizó mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie y mediante western blot con un suero policlonal α -F, antes y después del entrecruzamiento con glutaraldehído. La proteína no entrecruzada se veía como una única banda con una movilidad idéntica a la de la subunidad F1, demostrando que la coinfección con el vv_{furina} favorecía el procesamiento proteolítico completo de la proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_B1}$. Además, se observó que tras el tratamiento con glutaraldehído la proteína migraba como un trímero de proteína F (Figura 21-A). Finalmente, se comprobó la reactividad en ELISA de la proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_B1}$ así purificada (Figura 21-B). Al ME se observaron moléculas individuales de esta proteína en forma de cono (Figura 21-C), correspondientes a la forma post-fusión de la proteína F.

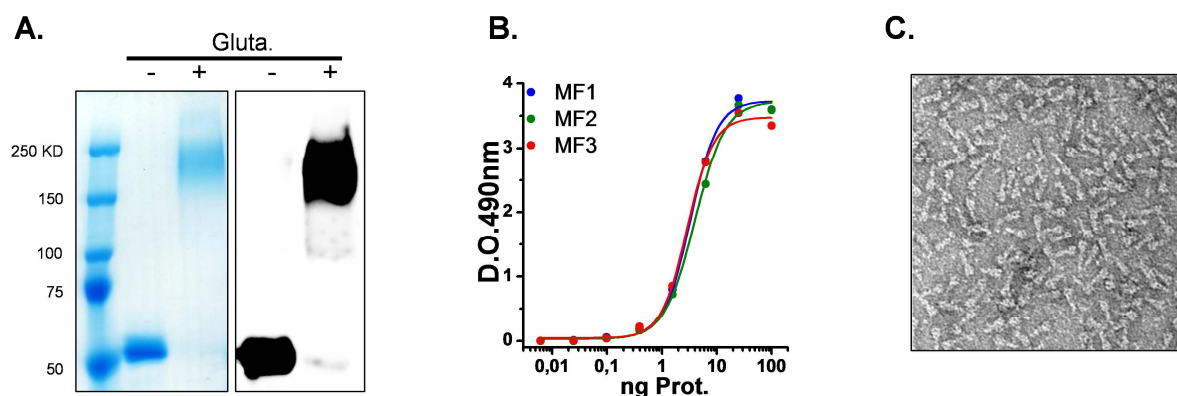


Figura 21. Análisis de la proteína F_{TM}-Δ103-111_KKRKRR_B1 totalmente cortada **A.** Ensayo de entrecruzamiento con glutaraldehído examinado mediante SDS-PAGE (7% de acrilamida) y tinción con azul de Coomassie (panel izquierdo) o mediante western blot con un suero policlonal α-F (panel derecho). **B.** ELISA indirecto de la proteína con los AcMs α-6HB. 400ng de cada AcM se utilizaron como anticuerpos de captura a los que se enfrentaron diluciones seriadas de la proteína F. El anticuerpo secundario utilizado fue un AcM α-His. **C.** Tinción negativa del trímero de proteína F_{TM}-Δ103-111_KKRKRR_B1 totalmente procesada.

En resumen, la adición del dominio de oligomerización foldon, la sustitución del sitio de corte natural por el sitio de corte II del VRSH, así como la delección de los 9 primeros aminoácidos del péptido de fusión hicieron que el rendimiento en la producción de la proteína F soluble del MNVH de la cepa NL/1/99 (sublinaje B1), estabilizada como trímero plegado en la conformación post-fusión, aumentara notablemente. En la Tabla 1 se muestran los cambios más significativos introducidos en las distintas construcciones descritas así como los rendimientos y formas mayoritarias obtenidas en las purificaciones.

Proteína	Cambios sucesivos introducidos en la proteína	Forma mayoritaria obtenida	Rendimiento (mg/litro sobrenadante)
F _{TM} _B1	Tag de 6-His tras el codón 490	Monómero sin procesar	1mg
F _{TM} _foldon_B1	Dominio de trimerización foldon	Trímero sin procesar	0.4mg
F _{TM} -Δ103-111_KKRKRR_B1	Delección de aa 103-111 e inserción del sitio de procesamiento proteolítico II de la proteína F del VRSH	Trímero post-fusión parcialmente procesado	0.6mg
F _{TM} -Δ103-111_KKRKRR_B1	Co-infección de vv_F _{TM} -Δ103-111_KKRKRR_B1 con vv_furina	Trímero post-fusión totalmente procesado	0.5mg

Tabla 5. Tabla resumen de las distintas construcciones de la proteína F_{TM}_B1 realizadas. Se indican los cambios más significativos introducidos en ellas, la forma mayoritaria que se obtuvo en la purificación así como el rendimiento obtenido de las mismas.

2.2. Obtención de un virus vaccinia recombinante que expresa una forma soluble de la proteína F de la cepa NL/1/00 (sublinaje A1) en la conformación post-fusión

Puesto que se han descrito diferencias sustanciales entre proteínas F de distintas cepas del MNVH (tales como dependencia de pH ácido para su actividad) que pueden reflejar diferencias estructurales significativas, se decidió abordar el clonaje y expresión de la proteína F soluble de la cepa NL/1/00 (sublinaje A1). Teniendo en cuenta la experiencia con la proteína F de la cepa B1 expuesta en los apartados anteriores se diseñó un virus vaccinia recombinante que expresara la proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_A1}$, puesto que esta era la proteína que se obtenía con más rendimiento y homogeneidad a partir de la proteína F de la cepa B1. Además, se cambió el aminoácido G294 por el aminoácido E294 ya que se había comprobado anteriormente que esta sustitución aumentaba la expresión de la proteína F completa de la cepa A1 en la superficie celular (Mas et al., 2011).

Una vez obtenido el $vv_{F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_A1}}$, se coinfectaron células CV-1 con dicho virus y con el vv_{furina} y la proteína correspondiente se purificó de nuevo mediante IMAC (Ni^{2+}) seguida de una cromatografía de filtración en gel. En el cromatograma de la filtración en gel obtenido se observó un pico mayoritario a los ~ 62ml similar al obtenido con la proteína F soluble del sublinaje B1 (Figura 22-B).

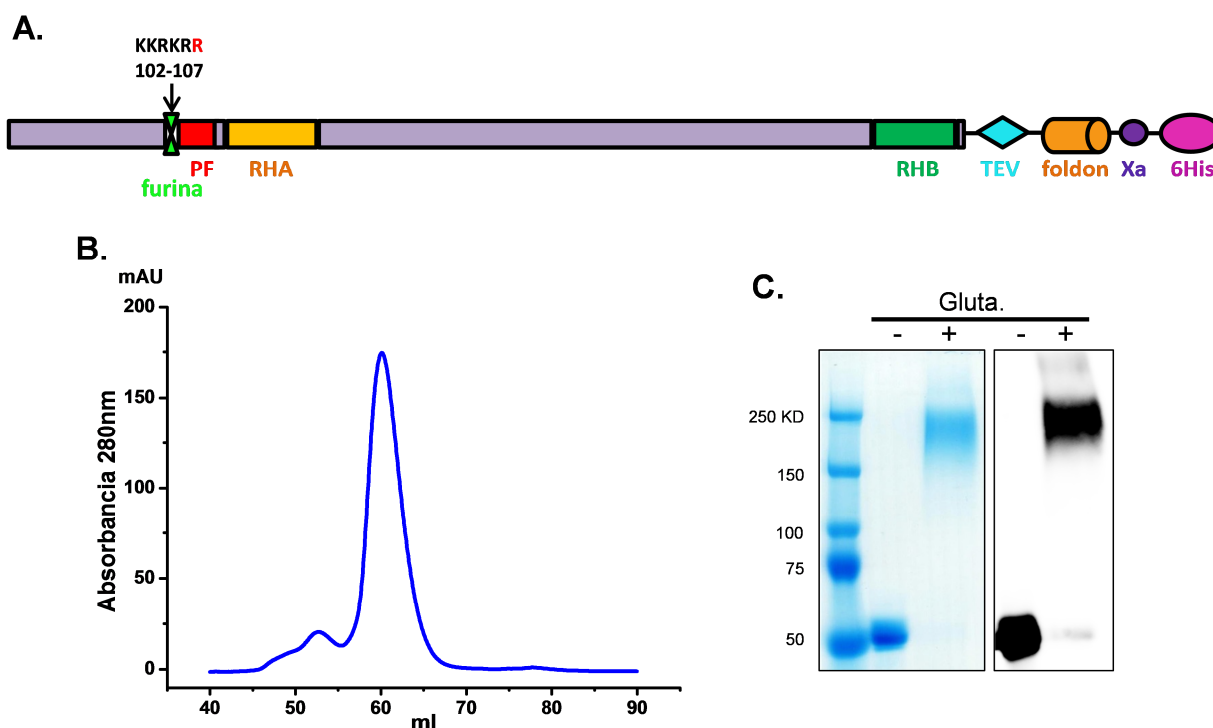


Figura 22. Purificación de la proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_A1}$ soluble. **A.** Diagrama del ectodominio de la proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_A1}$. **B.** Cromatograma de la filtración en gel. **C.** SDS-PAGE (7% de acrilamida) teñido con azul de Coomassie (panel izquierdo) y western blot revelado con un suero policlonal α -F (panel derecho) del material eluido a los 62ml, antes (-) o después (+) del tratamiento con glutaraldehído.

Esta nueva proteína se sometió a los mismos análisis que la proteína de la cepa B1. Así, se observó que la proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_A1}$ estaba totalmente procesada proteolíticamente generando una única banda en el gel de SDS-PAGE y en el western blot correspondiente a la subunidad F1. Además, tras el entrecruzamiento con glutaraldehído, la proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_A1}$ migraba como un trímero de gran tamaño (Figura 22-C). La misma proteína fue reconocida eficientemente por los tres AcMs α -6HB en ELISA (Figura 23-A) y de nuevo se observaron al ME moléculas en forma de cono correspondientes a la conformación post-fusión de la proteína F (Figura 23-B). En resumen, utilizando una estrategia análoga a la utilizada anteriormente para la proteína F de la cepa del sublinaje B1, se pudo obtener una forma soluble trimérica y totalmente procesada de la proteína F del sublinaje A1 y en la conformación post-fusión con un rendimiento similar al obtenido con la proteína del sublinaje B1 (0,6mg/litro de sobrenadante).

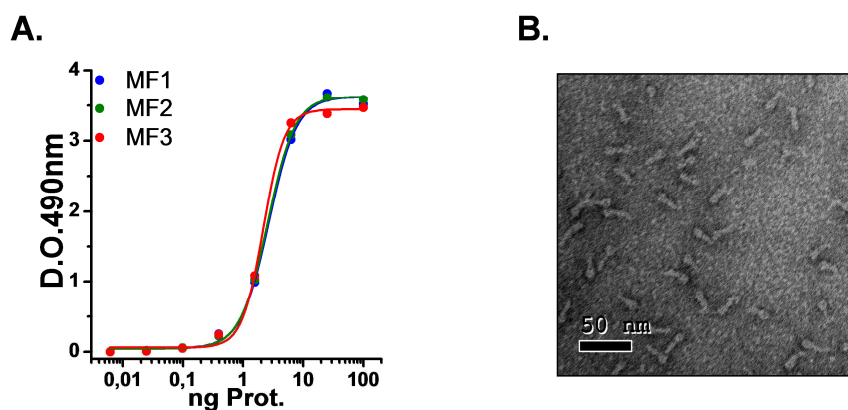


Figura 23. Reactividad de la proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_A1}$ con los AcMs α -6HB en un ELISA indirecto y tinción negativa de la misma observada al ME. A. 400ng de cada AcM se utilizaron como anticuerpos de captura a los que se enfrentaron diluciones seriadas de la proteína F. El anticuerpo secundario utilizado fue un AcM α -His. **B.** Tinción negativa observada al ME del trímero de proteína $F_{TM-\Delta 103-111_KKRKRR_A1}$.

3. Obtención de sueros policlonales dirigidos frente a distintas construcciones de la proteína F del MNVH de la cepa NL/1/99 (sublinaje B1)

Siguiendo estrategias utilizadas previamente en el laboratorio para analizar los tipos de anticuerpos (Acs) inducidos por distintas construcciones de la proteína F del VRSH, dos parejas de conejos New Zealand se inmunizaron con virus vaccinia recombinantes (vv) que expresaban dos construcciones distintas de la proteína F del MNVH de la cepa NL/1/99 (sublinaje B1): vv_F_{TM}⁻ que expresa el ectodominio de la proteína F y que se excreta al medio extracelular y vv_Fc que expresa la forma completa de la proteína F y que por tanto se ancla a la membrana de las células infectadas. Los Acs de cada suero se purificaron mediante cromatografía de afinidad empleando columnas de proteína A-Sepharosa. En cada caso se cuantificó el título de Acs α -F soluble (F_{TM}⁻ Δ 103-111_KKRKRR_B1) mediante ELISA, así como su capacidad neutralizante frente al virus recombinante MNVH_gfp_B1 que expresa la proteína GFP. La capacidad neutralizante se evaluó cuantificando la disminución de antígeno viral mediante ELISA en cultivos infectados por el virus en presencia de cantidades crecientes de los Acs.

Como se observa en la Figura 24-A y C, los sueros de los cuatro conejos tenían Acs que reconocieron a la proteína F_{TM}⁻ Δ 103-111_KKRKRR_B1 en ELISA siendo el título de Acs entre cada pareja de conejos (α -vv_F_{TM}⁻ o α -vv_Fc) muy similar. Además, las cuatro preparaciones de Acs eran capaces de neutralizar la infección por el MNVH_gfp_B1 (Figura 24-B y D) ya que a medida que se aumentaba la cantidad de Acs en los ensayos disminuía la cantidad de antígeno viral producido. Comparando los resultados obtenidos en las neutralizaciones realizadas con los Acs de cada pareja de conejos, los del conejo B fueron más neutralizantes que los del conejo A (Figura 24-D). En cambio, los Acs de los conejos C y D inmunizados con vv_Fc tenían una capacidad neutralizante equivalente (Figura 24-B). Teniendo en cuenta estos resultados, se escogieron los Acs de los conejos B (inmunizado con vv_F_{TM}⁻) y C (inmunizado con vv_Fc) para los siguientes estudios.

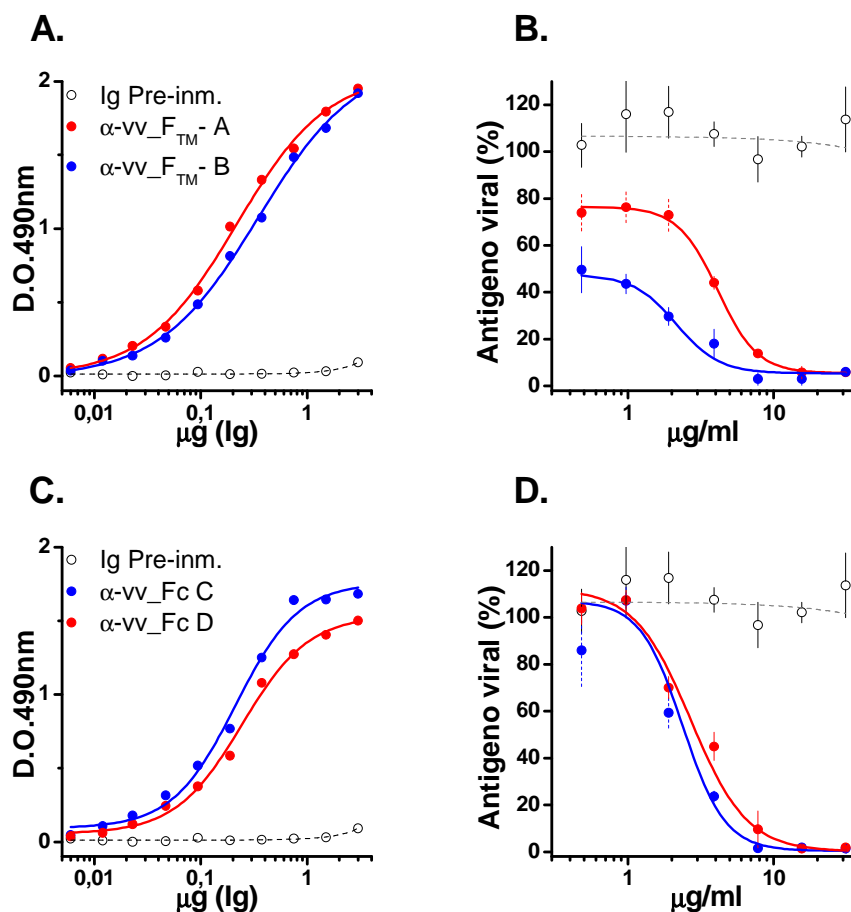


Figura 24. Titulación por ELISA (A y C) y capacidad neutralizante (B y D) de los Acs purificados de los sueros de conejos inmunizados con los virus vaccinias recombinantes indicados. A y C. Diluciones seriadas de los Acs se ensayaron en ELISA frente a 50ng de proteína proteína F_{TM}-B1. **B y D.** La capacidad neutralizante de los Acs se analizó en ensayos de microneutralización del virus recombinante MNVH_gfp_B1. La infectividad viral se cuantificó por la cantidad de antígeno viral producido y se representa como porcentaje del valor obtenido en ausencia de anticuerpos. En línea discontinua se representan los valores obtenidos con unos Acs obtenidos de un suero de conejo pre-inmune.

4. Estudio comparativo de los anticuerpos inducidos en conejos por las distintas construcciones de la proteína F del MNVH y la proteína F del VRSH

Nuestro laboratorio había descrito que la inmunización de conejos con virus vaccinia que expresaban distintas construcciones de la proteína F del VRSH inducían distintos tipos de anticuerpos (Acs) neutralizantes: así, mientras que un virus vv_F_{TM}⁻ inducía Acs que reconocían epítomos representados en la conformación post-fusión de la proteína F_VRSH (F_{TM}⁻), un virus vv_Fc inducía Acs neutralizantes que reconocían a la proteína post-fusión y otros Acs que reconocían epítomos que no están presentes en dicha conformación de la proteína (Magro et al., 2012). Para comprobar si virus vaccinia que expresasen distintas construcciones de la proteína F del MNVH también eran capaces de inducir en conejos Acs neutralizantes específicos de conformación, los Acs descritos en el apartado 3 se deplecionaron de aquellos que reconocen epítomos presentes en la proteína F_{TM}⁻ (post-fusión) utilizando una columna de Sepharosa que tenía unida covalentemente la proteína F_{TM}⁻_Δ103-111_KKRKRR_B1. Las fracciones de Acs

que no se unieron a la columna se recogieron y se las denominó ΔF_{TM^-} (Figura 25). Tras lavar la columna con PBS, los Ac que quedaron retenidos en la columna de Sepharosa- F_{TM^-} se eluyeron y se les denominó $\alpha-F_{TM^-}$. Tanto los Acs originales así como las fracciones de Acs no retenidos en la columna (ΔF_{TM^-}) y los eluidos de la misma ($\alpha-F_{TM^-}$) se ensayaron en ELISA frente a la misma proteína F_{TM^-} que se inmovilizó en la columna de Sepharosa ($F_{TM^-}_{\Delta 103-111_KKRKRR_B1}$). Así mismo, cada una de las fracciones de Acs así obtenidas se evaluaron en ensayos de neutralización del MNVH_gfp_B1. Todos los ensayos se llevaron a cabo en paralelo con Acs de conejo obtenidos de igual modo frente a proteínas F equivalentes del VRSH expresadas a partir de virus vaccinia recombinantes.

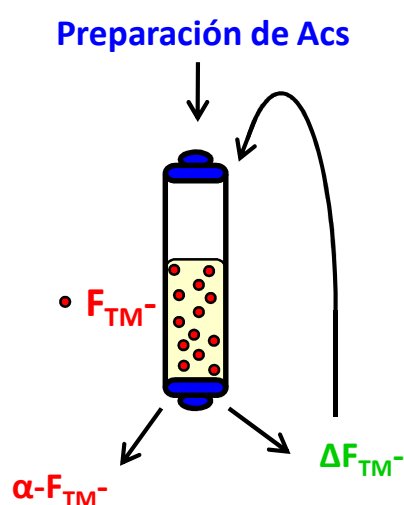


Figura 25. Esquema del método utilizado para el fraccionamiento de los anticuerpos anti proteína F. Las columnas de inmunoafinidad tienen unida la proteína $F_{TM^-}_{\Delta 103-111_KKRKRR_MNVH}$ o la proteína $F_{TM^-_VRSH}$ (bolitas rojas) ambas en la conformación post-fusión. La fracción de Acs que no se unió a la proteína se denominó ΔF_{TM^-} mientras que a los Acs que se unieron y posteriormente se eluyeron se les denominó $\alpha-F_{TM^-}$.

En primer lugar se fraccionaron los Acs de conejos inmunizados con los $vv_F_{TM^-}$ (MNVH y VRSH) (Figura 26). Los Acs no retenidos en las columnas de Sepharosa- F_{TM^-} (ΔF_{TM^-}) no reconocieron a las proteínas equivalentes a las que estaban inmovilizadas en las columnas en ELISA, lo que demostraba la eficiencia de las depleciones realizadas (Figura 26-A y C). Por el contrario los Acs eluidos de las columnas ($\alpha-F_{TM^-}$) mostraron una mayor reactividad con las proteínas correspondientes que los Acs originales, lo que demostraba que se habían enriquecido de Acs específicos frente a la proteína F al quedar retenidos en las columnas.

Los resultados de las neutralizaciones fueron los siguientes:

- **MNVH** (Figura 26-B): En la fracción de Acs no unida a la columna de Sepharosa- F_{TM^-} ($\alpha-vv_F_{TM^-}/\Delta F_{TM^-}$) no había Acs neutralizantes, puesto que la producción de antígeno viral no disminuyó en el ensayo de microneutralización incluso a las concentraciones mayores de Acs utilizadas. Por el contrario, los Acs eluidos de la columna ($\alpha-vv_F_{TM^-}/\alpha-F_{TM^-}$) mostraron mayor capacidad neutralizante que los Acs originales, aunque hay que tener en cuenta que

estos Acs son específicos de la proteína F del MNVH mientras que el material original contiene todos los Acs del suero del conejo.

- **VRSH** (Figura 26-D): Igual que en el caso del MNVH, la fracción de Acs no retenida en la columna de Sepharosa- F_{TM^-} ($\alpha\text{-vv-}F_{TM^-}/\Delta F_{TM^-}$) no mostró actividad neutralizante mientras que los Acs eluidos de la misma ($\alpha\text{-vv-}F_{TM^-}/\alpha\text{-}F_{TM^-}$) mostraron aparentemente mayor capacidad neutralizante que el material original.

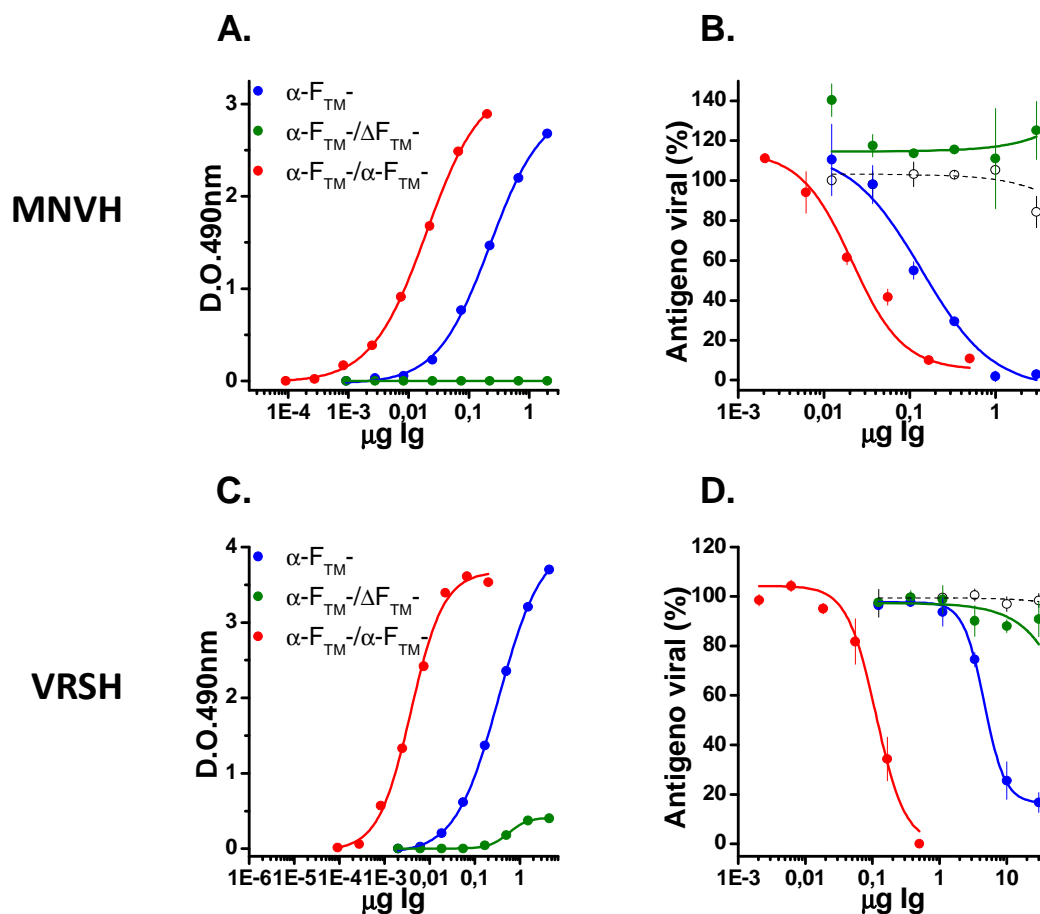


Figura 26. Análisis de las fracciones de Acs obtenidas a partir de los sueros policlonales $\alpha\text{-vv-}F_{TM^-}$ MNVH y $\alpha\text{-vv-}F_{TM^-}$ VRSH tras el fraccionamiento mediante cromatografía de afinidad con las columnas de proteínas F_{TM^-} MNVH y F_{TM^-} VRSH. A y C. Diluciones seriadas de las fracciones de Acs indicadas se ensayaron en ELISA frente a 50ng de las proteínas F_{TM^-} MNVH y F_{TM^-} VRSH. B y D. La capacidad neutralizante de las fracciones de Acs se analizó en ensayos de microneutralización del virus MNVH_gfp_B1 y del virus VRSH_Long. La infectividad viral se cuantificó por la cantidad de antígeno viral producido y se representa como porcentaje del valor obtenido en ausencia de Acs. En línea discontinua se representan los valores obtenidos con Acs de un suero de conejo pre-inmune.

Por tanto, la inmunización de conejos con virus vaccinia que expresan formas solubles de las proteínas F del MNVH y del VRSH ($\text{vv-}F_{TM^-}$) induce Acs neutralizantes que reconocen a las proteínas inmovilizadas en las columnas de Sepharosa.

Seguidamente se fraccionaron los Acs inducidos en conejos tras la inmunización con vv_Fc del MNVH o del VRSH. Los resultados de los ELISAs (Figura 27-A y C) demostraron que la depleción de Acs que reconocían a las proteínas solubles inmovilizadas en las columnas de Sepharosa había sido eficiente, como en el caso de los Acs inducidos por los vv_F_{TM}⁻ (Fig.27-A y C). Los resultados de las neutralizaciones fueron los siguientes:

- **MNVH** (Figura 27-B): la fracción de Acs que no se unió a la columna de Sepharosa-F_{TM}⁻ (α -vv_Fc/ Δ F_{TM}⁻) no mostró capacidad neutralizante puesto que no se redujo la producción de antígeno viral a ninguna de las concentraciones utilizadas, mientras que los Acs α -vv_Fc/ α -F_{TM}⁻ eluidos de la misma fueron más neutralizantes que el material original. Si se comparan los resultados de las Figuras 26-B y 27-B se observa que todos los Acs neutralizantes inducidos en las inmunizaciones con vv_F_{TM}⁻ y con vv_Fc se unieron a la proteína F_{TM}⁻ de la columna.
- **VRSH** (Figura 27-D): En este caso, tanto la fracción de Acs no retenidos en la columna de Sepharosa-F_{TM}⁻ (α -vv_Fc/ Δ F_{TM}⁻) como los Acs eluidos de la misma (α -vv_Fc/ α -F_{TM}⁻) contenían Acs neutralizantes. Hay que resaltar que la fracción de Acs α -vv_Fc/ Δ F_{TM}⁻ que no se unió a la columna mantuvo la mayor parte de la capacidad neutralizante puesto que en el ensayo de microneutralización inhibieron la producción de antígeno viral aparentemente con la misma eficacia que el material de partida (α -vv_Fc). Además, si se compara la neutralización mediada por la fracción de Acs α -vv_Fc/ Δ F_{TM}⁻ y los Acs vv_Fc/ α -F_{TM}⁻, se puede concluir que estos últimos tienen menor capacidad neutralizante puesto que son solo Acs dirigidos frente a la proteína F_{TM}⁻, mientras que en la fracción de Acs α -vv_Fc/ Δ F_{TM}⁻ los Acs específicos de la proteína F son solo una porción minoritaria del total de Acs presentes en el suero.

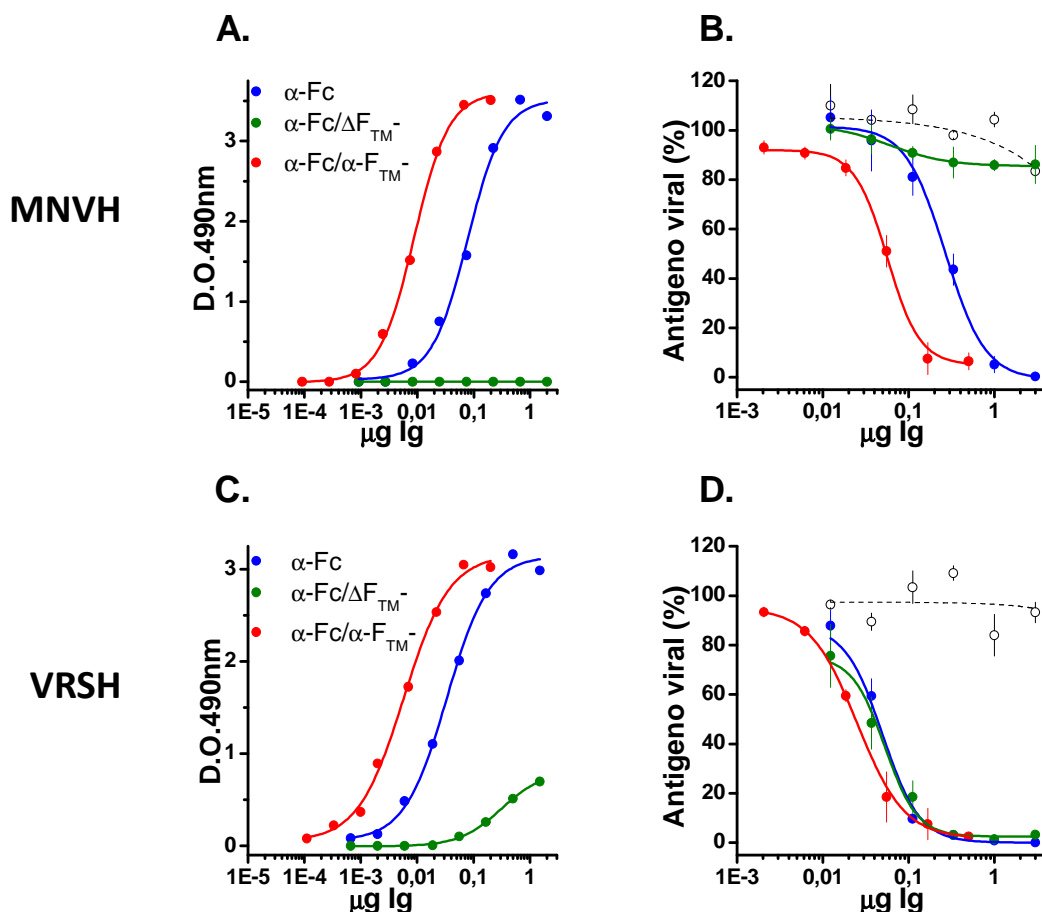


Figura 27. Análisis de las fracciones de Acs obtenidas a partir de los sueros policlonales α -vv-Fc_MNVH y α -vv-Fc_VRSH tras el fraccionamiento mediante cromatografía de afinidad con las columnas de proteínas F_{TM^-} _MNVH y F_{TM^-} _VRSH. A y C. Diluciones seriadas de las fracciones de Acs indicadas se ensayaron en ELISA frente a 50ng de las proteínas F_{TM^-} _MNVH y F_{TM^-} _VRSH. B y D. La capacidad neutralizante de las fracciones de Acs se analizó en ensayos de microneutralización del virus MNVH_gfp_B1 y del virus VRSH_Long. La infectividad viral se cuantificó por la cantidad de antígeno viral producido y se representa como porcentaje del valor obtenido en ausencia de Acs. En línea discontinua se representan los valores obtenidos con Acs de un suero de conejo pre-inmune.

Por tanto, mientras que la inmunización de conejos con virus vaccinia que expresa la proteína Fc del MNVH induce únicamente Acs neutralizantes que se unen a la columna de Sepharosa- F_{TM^-} , en el caso de la proteína F del VRSH, virus vaccinia equivalentes inducen Acs neutralizantes que en su mayor parte no son retenidos en la columna de Sepharosa- F_{TM^-} .

En resumen (Tabla 6), la inmunización de conejos con virus vaccinia que expresan una forma soluble de la proteína F del MNVH ($vv_{F_{TM^-}}$) o la forma completa (vv_{Fc}) de la misma proteína induce únicamente Acs neutralizantes que reconocen epítopos representados en la proteína F_{TM^-} de la columna de Sepharosa que, como se ha demostrado en el Apartado 2.1, está en la conformación post-fusión. Por el contrario, en el caso del VRSH, mientras que la inmunización de conejos con $vv_{F_{TM^-}}$ induce únicamente Acs neutralizantes que reconocen epítopos presentes en la conformación post-fusión de la proteína F, la inmunización con vv_{Fc}

induce Acs neutralizantes que mayoritariamente reconocen epítomos no representados en la conformación post-fusión de la proteína y que presumiblemente reconocen a la proteína F del VRSH en la conformación pre-fusión (Magro et al., 2012). Como se discutirá posteriormente, es probable que estas diferencias se deban a las distintas conformaciones que pueden adoptar las proteínas F del MNVH y del VRSH.

	α -vv_ F_{TM^-}			α -vv_Fc		
	α -vv_ F_{TM^-}	ΔF_{TM^-}	α - F_{TM^-}	α -vv_Fc	ΔF_{TM^-}	α - F_{TM^-}
MNVH	++	-	+++	++	-	+++
VRSH	+	-	+++	+++	+++	++

Tabla 6. Resumen de la capacidad neutralizante de las fracciones obtenidas mediante la depleción de los anticuerpos α - F_{TM^-} a partir de las preparaciones policlonales α -vv_ F_{TM^-} y α -vv_Fc del MNVH y del VRSH.

Recientemente, se ha descrito que un monómero soluble de la proteína F del VRSH reproduce epítomos exclusivos de la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH ya que es capaz de unir Acs neutralizantes que no reconocen a la proteína en la conformación post-fusión (Swanson et al., 2014). Puesto que en la preparación de Acs de conejo obtenida mediante la inmunización con vv_Fc_VRSH hay Acs neutralizantes que no reconocen a la proteína F_{TM^-} (post-fusión), se planteó utilizar columnas de Sepharosa con monómero de proteína F unido covalentemente para el fraccionamiento de esos anticuerpos. En paralelo se hizo el mismo fraccionamiento utilizando el monómero de la proteína F del MNVH (Figura 28-B).

En ambos casos, los monómeros (Mon) solubles de las proteínas F del MNVH y F del VRSH se inmovilizaron en columnas de Sepharosa. Los Acs α -vv_Fc (MNVH y VRSH) se pasaron por la columna de Sepharosa-Mon correspondiente y se recogieron las fracciones de Acs que no se unieron a las columnas denominándolas α -vv_Fc/ Δ monómero (Figura 28). Después de lavar las columnas con PBS, los Acs retenidos en las columnas de Sepharosa-Mon se eluyeron y se les dio el nombre α -vv_Fc/ α -monómero. Los Acs originales (α -vv_Fc) así como las fracciones de Acs no retenidos en las columnas (α -vv_Fc/ Δ monómero) y los eluidos de las mismas (α -vv_Fc/ α -monómero) se evaluaron en ELISA frente al monómero correspondiente (Mon_MNVH o Mon_VRSH) y en ensayos de neutralización.

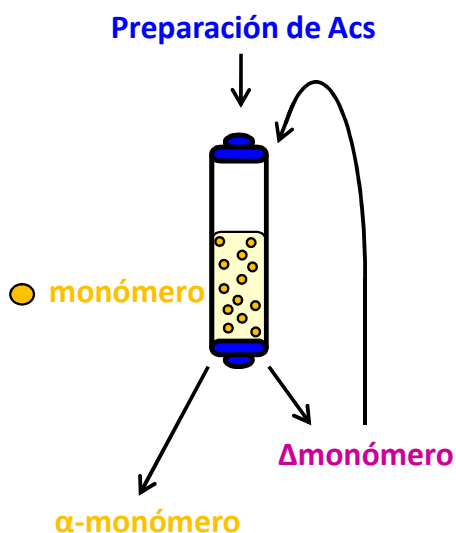


Figura 28. Esquema del método utilizado para la depleción de los anticuerpos anti monómero. Las columnas de inmunoadfinidad tienen unidas la forma monomérica de la proteína F del MNVH o de la proteína F del VRSH (bolas amarillas). La fracción de Acs que no se unió a la columna se denominó Δ monómero mientras que a los Acs que se unieron y posteriormente se eluyeron se les denominó α -monómero.

En ambos casos, las fracciones α -vv_Fc/ Δ monómero no tuvieron reactividad con los monómeros en ELISA (Figura 29-A y C). En cambio, los Acs eluidos de las columnas (α -vv_Fc/ α -monómero) mostraron una mayor reactividad con los monómeros que los materiales originales, ya que estas fracciones contenían únicamente Acs α -monómero.

En el ensayo de neutralización del MNVH con las distintas fracciones de Acs (Figura 29-B) se observó que en la fracción α -vv_Fc/ Δ monómero (Acs no retenidos en la columna) no había Acs neutralizantes. En cambio, los Acs eluidos de la columna (α -vv_Fc/ α -monómero) tuvieron mayor capacidad neutralizante que el material original (α -vv_Fc) aunque de nuevo hay que tener en cuenta que en esta fracción todos los Acs eran específicos de la proteína F mientras que el material original contenía todos los Acs presentes en el suero del conejo. Es decir, todos los Acs neutralizantes inducidos por el vv_Fc reconocen al monómero de la proteína F del MNVH de la columna.

En la figura 29-D se muestra el ensayo de neutralización del VRSH con las fracciones obtenidas a partir de los Acs α -vv_Fc. Se observó que la fracción de Acs no unida a la columna de Sepharosa-Mon (α -vv_Fc/ Δ monómero) había perdido la mayor parte de la capacidad de neutralizar al VRSH que había en el material original (α -vv_Fc). Por el contrario, los Acs que se eluyeron de la columna (α -vv_Fc/ α -monómero) mostraron mayor capacidad neutralizante que el material original. Si se compara la neutralización mediada por los Acs vv_Fc/ α -F_{TM}- (Figura 27-D) y los Acs α -vv_Fc/ α -monómero se puede concluir que estos últimos tienen mayor capacidad neutralizante ya que a la misma concentración de Acs se detecta menor antígeno viral.

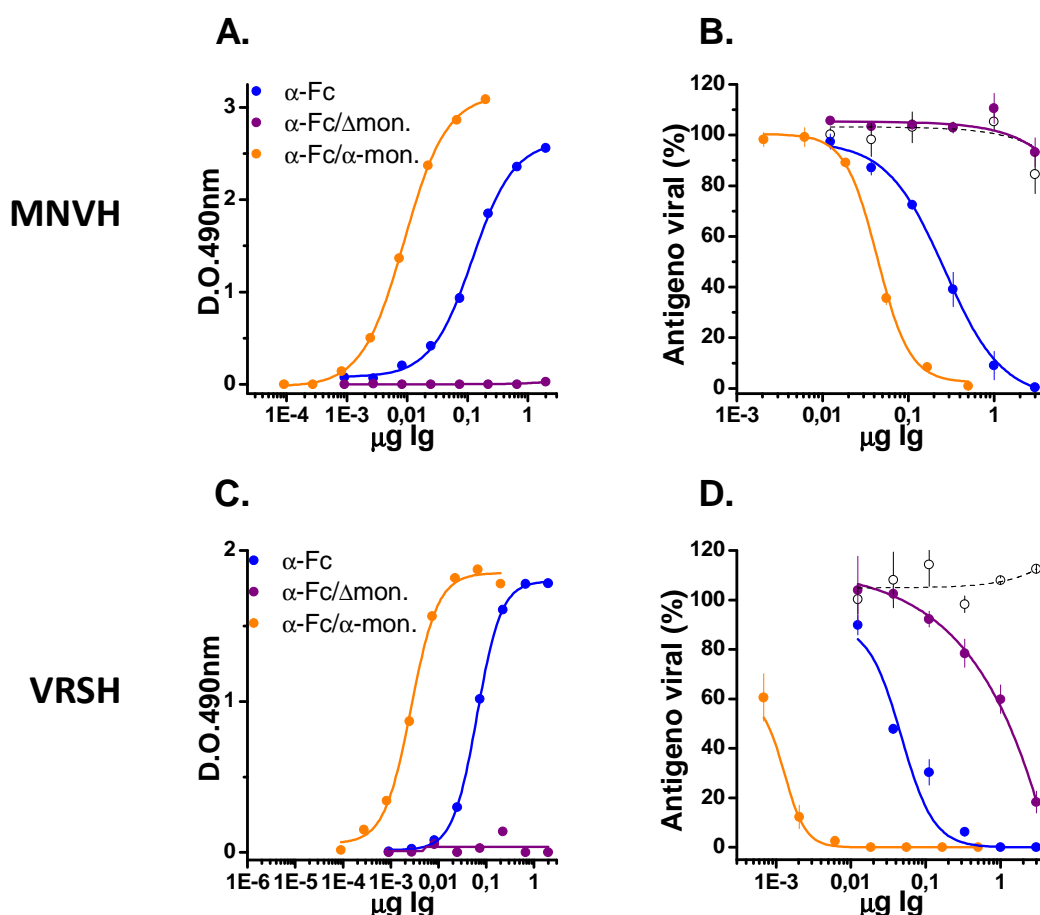


Figura 29. Análisis de las fracciones de Acs obtenidas a partir de los sueros policlonales α -vv-Fc_MNVH y α -vv-Fc_VRSH tras el fraccionamiento mediante cromatografía de afinidad con las columnas de Mon_MNVH y Mon_VRSH. A y C. Diluciones seriadas de las fracciones de Acs indicadas se ensayaron en ELISA frente a 100ng de los monómeros de las proteínas F del MNVH y del VRSH. B y D. La capacidad neutralizante de las fracciones de Acs se analizó en ensayos de microneutralización del virus MNVH_gfp_B1 y del virus VRSH_Long. La infectividad viral se cuantificó por la cantidad de antígeno viral producido y se representa como porcentaje del valor obtenido en ausencia de Acs. En línea discontinua se representan los valores obtenidos con Acs de un suero de conejo pre-inmune.

En resumen (Tabla 7), el monómero soluble de la proteína F del MNVH inmovilizado en la columna de Sepharosa reproduce epítomos de la proteína F que son reconocidos por los Acs neutralizantes presentes en la preparación α -vv_Fc. Por otro lado, el monómero soluble de la proteína F del VRSH (Mon_VRSH) exhibe epítomos distintos a los que están representados en la conformación post-fusión de la proteína F (F_{TM^-} _VRSH) puesto que, a diferencia de lo observado con la proteína F_{TM^-} , el Mon_VRSH es capaz de deplecionar la mayor parte de los Acs neutralizantes α -F presentes en la preparación α -vv_Fc (Tabla 7). Además, los Acs que se unen al Mon_VRSH tienen mayor capacidad neutralizante que los Acs que se unen a la proteína F_{TM^-} _VRSH. Teniendo en cuenta los resultados presentados por Swanson y colaboradores (Swanson et al., 2014), el Mon_VRSH soluble utilizado en este trabajo también exhibe presumiblemente epítomos exclusivos de la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH.

		α -vv_Fc					
		Columna Sepharosa-Mon			Columna Sepharosa-F _{TM} ⁻		
		α -vv_Fc	Δ mon	α -mon	α -vv_Fc	Δ F _{TM} ⁻	α -F _{TM} ⁻
MNVH	++	-	+++	++	-	+++	
VRSH	+++	+	++++	+++	+++	++	

Tabla 7. Resumen de la capacidad neutralizante de las fracciones obtenidas mediante la depleción de los anticuerpos α -monómero y α -F_{TM}⁻ del MNVH y del VRSH a partir de las preparaciones policlonales α -vv_Fc del MNVH y del VRSH.

5. Estudio comparativo de los anticuerpos de los anticuerpos neutralizantes dirigidos frente a las proteínas F del MNVH y del VRSH presentes en una preparación de inmunoglobulinas humanas

Como se mencionó en la Introducción, RespiGam (RG) es una preparación de inmunoglobulinas (Igs) humanas obtenida a partir del plasma de donantes con altos títulos de Acs neutralizantes frente al VRSH. Para el VRSH, se demostró que en el RG hay Acs neutralizantes que reconocen a la proteína F del VRSH en la conformación post-fusión (F_{TM}⁻) y otros Acs con mayor capacidad neutralizante que no reconocen a la proteína F_{TM}⁻. Estos últimos Acs presumiblemente reconocen epítopos exclusivos de la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH (Magro et al., 2012, Sastre et al., 2005). En el RG también hay Acs con capacidad de neutralizar la infectividad del MNVH. Para comparar el tipo de Acs neutralizantes presentes en el RG dirigidos frente a las proteínas F del MNVH y del VRSH, el RG se fraccionó utilizando las columnas de Sepharosa-F_{TM}⁻ y las columnas de Sepharosa-Mon del MNVH y del VRSH descritas en el apartado anterior (Figuras 25 y 28 respectivamente).

En primer lugar se deplecionaron los Acs α -F_{TM}⁻ (MNVH y VRSH) presentes en el RG y nuevamente se comprobó por ELISA que la depleción había sido completa, ya que las fracciones RG/ Δ F_{TM}⁻ no tuvieron reactividad con las proteínas F_{TM}⁻ (Figura 30-A y C). Por el contrario, los Acs eluidos de las columnas (RG/ α -F_{TM}⁻) exhibieron mayor reactividad con las proteínas F_{TM}⁻ que el RG.

En el ensayo de neutralización del MNVH (Figura 30-B) se observó que la capacidad neutralizante de los Acs eluidos de la columna de Sepharosa-F_{TM}⁻ (RG/ α -F_{TM}⁻) fue

mayor a la observada con el **RG**, mientras que en la fracción de Acs que no se unieron a la columna (**RG/ ΔF_{TM^-}**) no había Acs neutralizantes. Es decir, igual a los resultados expuestos en el apartado anterior con los Acs inducidos mediante la inmunización de conejos con virus vaccinia que expresaban distintas construcciones de la proteína F del MNVH, los Acs neutralizantes presentes en el **RG** que, presumiblemente se han inducido por infecciones naturales del virus en humanos, fueron deplecionados por la proteína F en la conformación post-fusión (F_{TM^-}).

Por el contrario, en el caso del **VRSH** tanto el **RG** como la fracción de Acs **RG/ ΔF_{TM^-}** (Acs no retenidos en la columna) así como los Acs eluidos de la columna (**RG/ $\alpha-F_{TM^-}$**) fueron capaces de neutralizar la infectividad del VRSH (Figura 30-D). Es de resaltar que la fracción de Acs **RG/ ΔF_{TM^-}** retiene la mayor parte de la actividad neutralizante que había originalmente en el RG. Además, si se compara la neutralización mediada por los Acs **RG/ $\alpha-F_{TM^-}$** y los Acs **RG/ ΔF_{TM^-}** , se puede concluir que estos últimos tienen mayor capacidad neutralizante puesto que en la fracción **RG/ ΔF_{TM^-}** los Acs específicos de la proteína F solo son una parte minoritaria del total de Acs presentes en el **RG**, mientras que los Acs **RG/ $\alpha-F_{TM^-}$** son todos específicos de la proteína F del VRSH. Es decir, los Acs neutralizantes humanos presentes en el **RG** que se han inducido frente a infecciones naturales por el VRSH, reconocen mayoritariamente epítomos que no están representados en la conformación post-fusión de la proteína F del VRSH (F_{TM^-}) (Magro et al., 2012, Sastre et al., 2005).

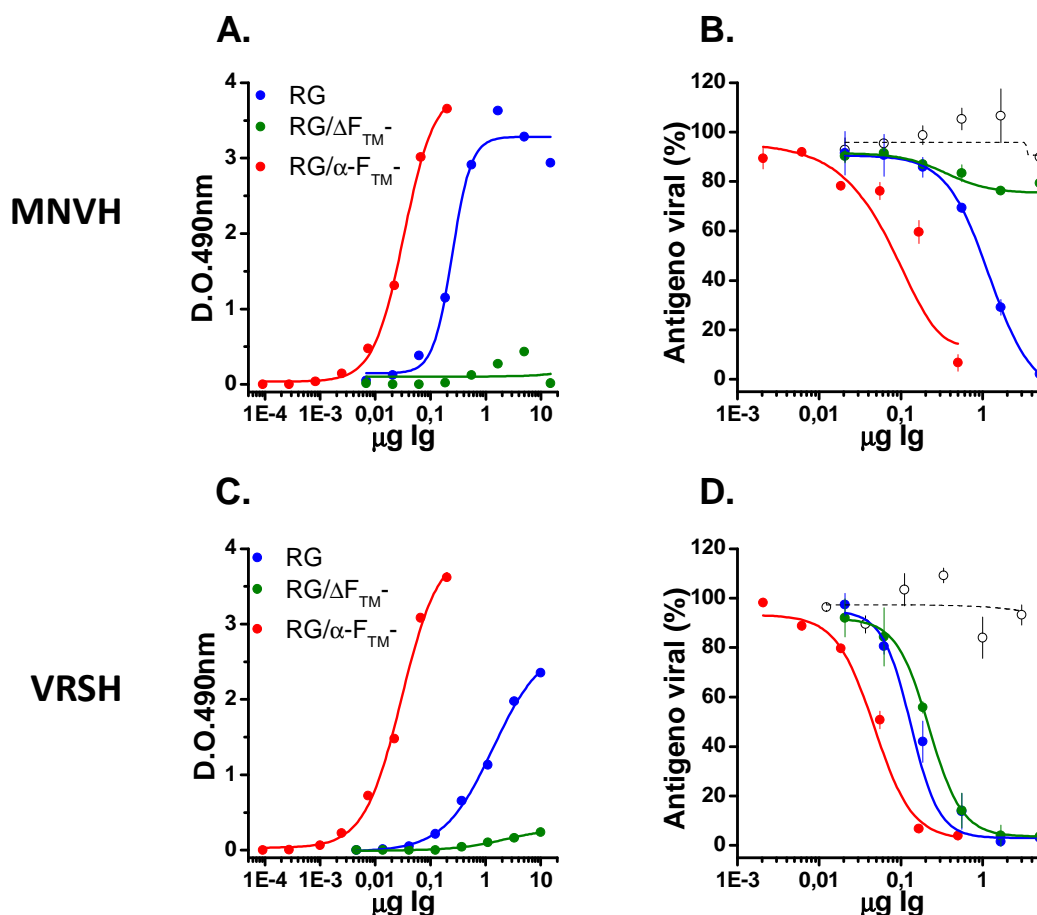


Figura 30. Análisis de las fracciones de Acs obtenidas a partir del RespiGam tras el fraccionamiento mediante cromatografía de afinidad con las columnas de proteínas F_{TM}⁻_{MNVH} y F_{TM}⁻_{VRSH}. A y C. Diluciones seriadas de las fracciones de Acs indicadas se ensayaron en ELISA frente a 50ng de las proteínas F_{TM}⁻_{MNVH} y F_{TM}⁻_{VRSH}. B y D. La capacidad neutralizante de las fracciones de Acs se analizó en ensayos de microneutralización del virus MNVH_gfp_B1 y del virus VRSH_Long. La infectividad viral se cuantificó por la cantidad de antígeno viral producido y se representa como porcentaje del valor obtenido en ausencia de anticuerpos. En línea discontinua se representan los valores obtenidos con Acs de un suero de conejo pre-immune.

Por otro lado, una vez realizada la depleción de los Acs α-monómero presentes en el RG con las columnas de Sepharosa-Mon (MNVH y VRSH) y una vez comprobado mediante ELISA que la depleción había sido completa (Figura 31-A y C), las fracciones obtenidas se evaluaron en ensayos de neutralización.

En la neutralización del MNVH (Figura 31-B), la fracción de Acs no retenidos en la columna Sepharosa-Mon (RG/Δmonómero) no mostró capacidad neutralizante superior a la de una preparación de Acs control proveniente de un suero de conejo pre-immune mientras que los Acs RG/α-monómero eluidos de la columna tuvieron mayor capacidad neutralizante que el RG. De nuevo, se reproducen los resultados obtenidos mediante el fraccionamiento de los Acs α-vv_Fc con la columna de Sepharosa-Mon: los Acs neutralizantes que hay en el RG reconocen epítomos presentes en el monómero de proteína F del MNVH de la columna.

En el caso del **VRSH** (Figura 31-D), los Acs eluidos de la columna (**RG/ α -monómero**) exhibieron una capacidad neutralizante mayor a la observada con el **RG**, mientras que la fracción de Acs no retenidos (**RG/ Δ monómero**) había perdido la mayor parte de la capacidad neutralizante presente en el **RG**. Si se compara la gráfica de neutralización obtenida con los Acs **RG/ α -F_{TM}⁻** (Figura 30-D) y la gráfica obtenida con los Acs **RG/ α -monómero** se puede concluir que estos últimos tienen mayor capacidad neutralizante ya que a la misma dilución de Acs se detecta menor antígeno viral reproduciendo los resultados obtenidos con las fracciones de Acs equivalentes obtenidas a partir de los Acs **α -vv_Fc** (Figuras 27-D y 29-D).

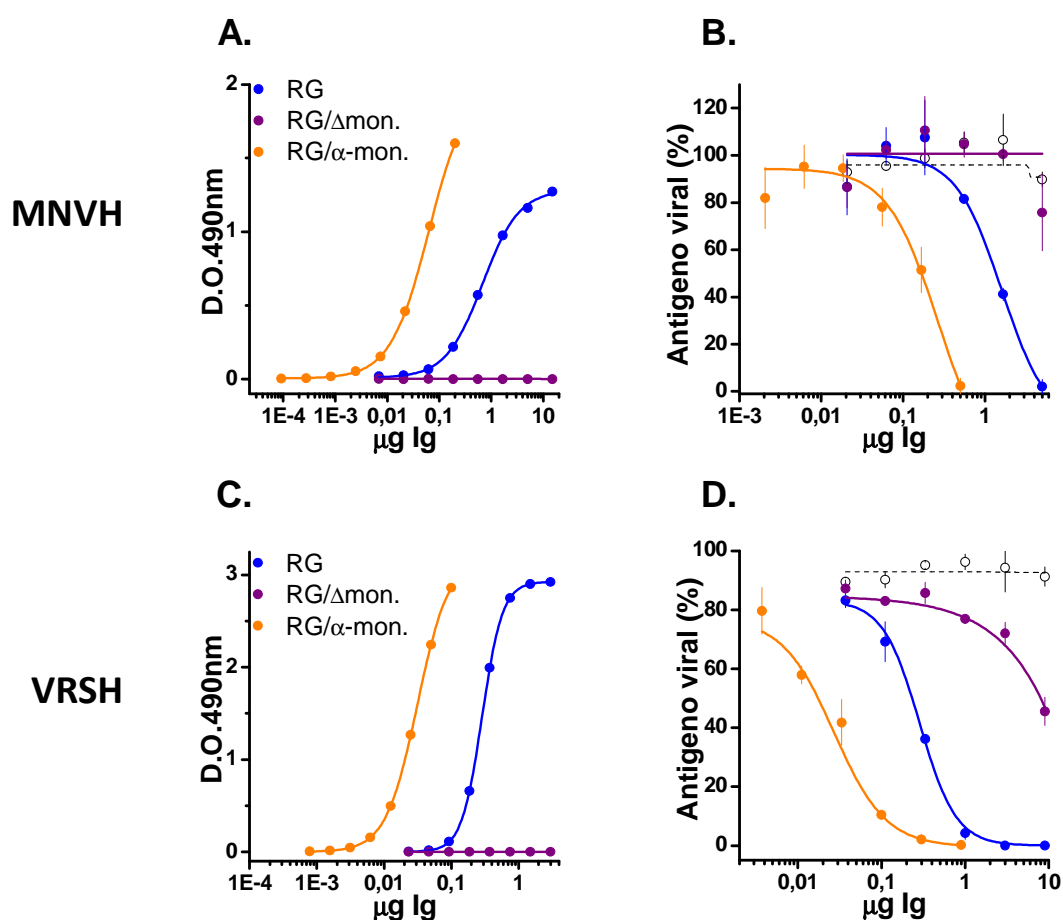


Figura 31. Análisis de las fracciones de Acs obtenidas a partir del RespiGam tras el fraccionamiento mediante cromatografía de afinidad con las columnas de monómero_MNVH y monómero_VRSH. A y C. Diluciones seriadas de las fracciones de Acs indicadas se ensayaron en ELISA frente a 100ng de los monómeros de MNVH y VRSH. **B y D.** La capacidad neutralizante de las fracciones de Acs se analizó en ensayos de microneutralización del virus MNVH_gfp_B1 y del virus VRSH_Long. La infectividad viral se cuantificó por la cantidad de antígeno viral producido y se representa como porcentaje del valor obtenido en ausencia de anticuerpos. En línea discontinua se representan los valores obtenidos con Acs de un suero de conejo pre-immune.

En resumen (Tabla 8), en el **RG** existen Acs neutralizantes dirigidos frente a la proteína F del MNVH que son deplecionados tanto por una forma soluble de la proteína F en la conformación post-fusión (**F_{TM}⁻**), como por una forma monomérica de la misma. Por otro lado,

en el caso del VRSH, mientras que la fracción obtenida al deplecionar del RG los Acs α -F_{TM-} (RG/ Δ F_{TM-}) conserva la mayor parte de la capacidad neutralizante presente en el RG, la fracción obtenida al deplecionar del RG los Acs α -mon (RG/ Δ monómero) tiene fuertemente disminuida dicha capacidad, lo que indica que la proteína F_{TM-}_VRSH y el Mon_VRSH tienen representados epítomos distintos reconocidos por Acs neutralizantes (Swanson et al., 2014).

RespiGam							
		Columna Sepharosa-F _{TM-}			Columna Sepharosa-mon.		
		RG	Δ F _{TM-}	α -F _{TM-}	RG	Δ mon	α -mon
MNVH		++	-	+++	++	-	+++
VRSH		+++	+++	++	+++	+	++++

Tabla 8. Resumen de la capacidad neutralizante de las fracciones obtenidas mediante la depleción de los anticuerpos α -F_{TM-} y α -monómero del MNVH y del VRSH a partir de la preparación policlonal de Igs humanas RespiGam (RG).

6. Neutralizaciones cruzadas del MNVH y del VRSH con anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos frente a las proteínas F del MNVH y del VRSH

En la introducción se ha mencionado que la proteína F del MNVH y la proteína F del VRSH tienen un 33% de identidad de secuencia aminoacídica. Se ha descrito un anticuerpo monoclonal (AcM) humano (MPE8) dirigido frente a la proteína F del VRSH con capacidad de neutralizar al MNVH (Corti et al., 2013). Por otro lado, se ha descrito un AcM humano (54G10) dirigido frente a la proteína F del MNVH con capacidad de neutralizar al VRSH (Schuster et al., 2014). El AcM 54G10 se une a la proteína F del MNVH en el sitio antigénico 5-6 que se localiza en una región equivalente a la del sitio antigénico IV de la proteína F del VRSH (Figura 11 de la introducción). En nuestro laboratorio se dispone de una batería de AcMs murinos neutralizantes dirigidos frente al sitio antigénico IV de la proteína F del VRSH. Se examinó si estos AcMs reconocían a la proteína F del MNVH mediante un ELISA indirecto en el que los pocillos de la placa se cubrieron con 400ng de cada uno de los AcMs en estudio y se enfrentaron con diluciones seriadas de las proteínas F_{TM-} Δ 103-111_KKRKRR_MNVH (A1 y B1) o la proteína F_{TM-}_VRSH (Figura 32). En los paneles A y B de la Figura 32 se observa que únicamente dos de esos AcMs α -F_{TM-}_VRSH reconocieron a las proteínas F_{TM-}_A1 y F_{TM-}_B1: el AcM 101F con el

que se obtuvo una densidad óptica a 490nm elevada y el AcM 105F que únicamente en la dilución más baja de proteína exhibió señal.

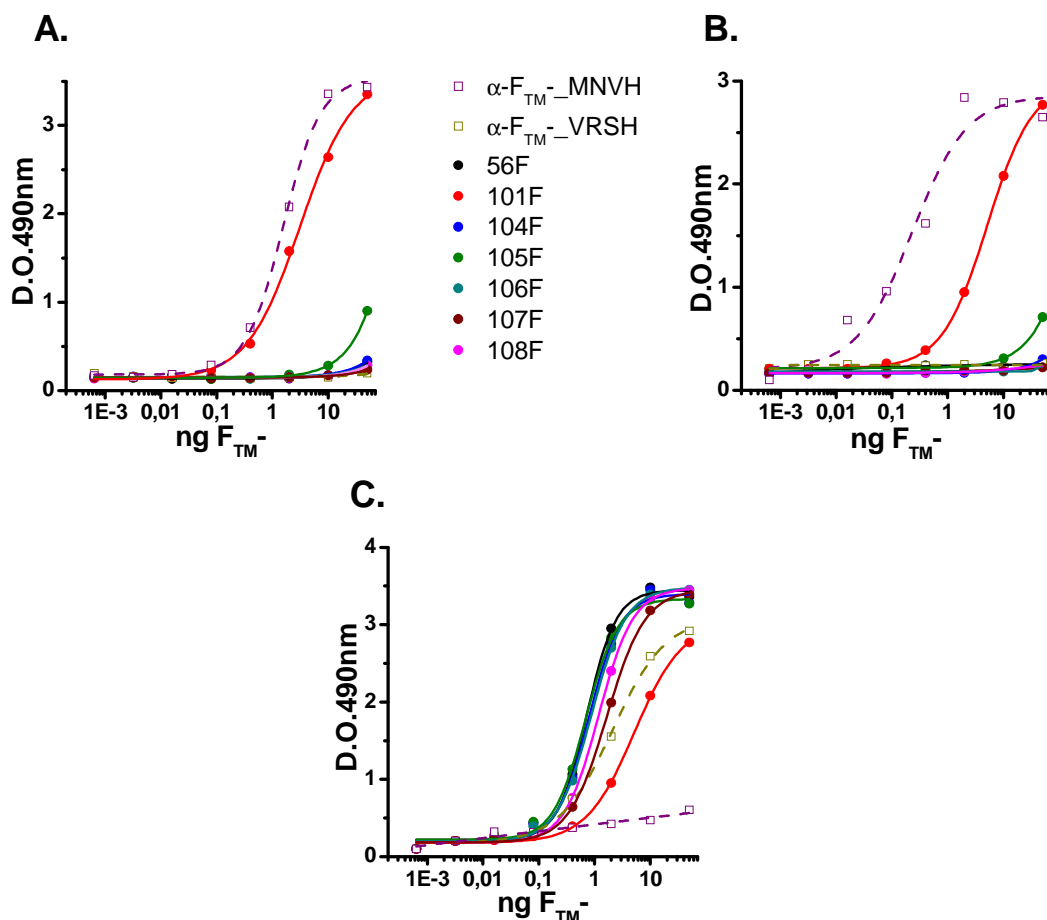


Figura 32. Reactividad de los AcMs murinos dirigidos frente al sitio antigénico IV de la proteína F del VRSH con la proteína F_{TM}-MNVH_A1 (A), F_{TM}-MNVH_B1 (B) y con la proteína F_{TM}- del VRSH (C) en un ELISA indirecto. Diluciones seriadas de las proteínas F_{TM}- se ensayaron utilizando 400ng de cada uno de los AcMs como anticuerpos de captura. Como controles se utilizaron Acs policlonales de conejo α-F_{TM}-MNVH y α-F_{TM}-VRSH. Los inmunocomplejos formados se detectaron con un Ac α-Histidinas.

Por otro lado, se analizó si los AcMs 101F y 105F tenían capacidad de neutralizar la infectividad de los virus recombinantes MNVH_gfp_A1 y MNVH_gfp_B1 (Figura 33). En el ensayo se incluyó como control negativo de neutralización el AcM 107F que no reconoció a las proteínas F_{TM}-A1 y F_{TM}-B1 en ELISA y como control positivo el AcM murino MF14, que va dirigido frente a la proteína F del MNVH. El AcM 101F fue capaz de neutralizar la infectividad de ambos virus (MNVH_A1 y B1) ya que cuando se aumentó la cantidad de AcM disminuyó la cantidad de antígeno viral producido; en cambio el AcM 105F no mostró capacidad neutralizante frente a ninguno de los dos virus.

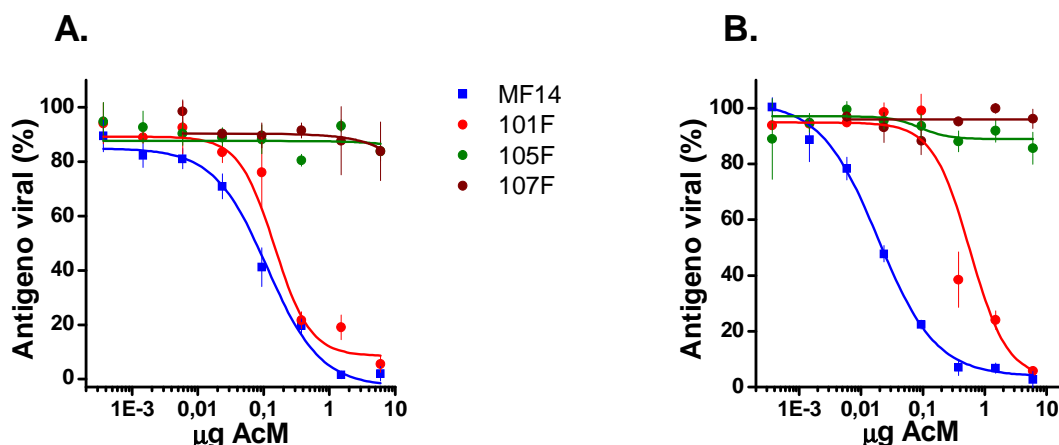


Figura 33. Análisis de la capacidad neutralizante de los AcMs murinos dirigidos frente al sitio antigénico IV de la proteína F del VRSH frente al (A) MNVH_gfp_B1 y (B) al MNVH_gfp_A1. Diluciones seriadas de los AcM se incubaron con una cantidad fija de cada uno de los virus durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla se utilizó para infectar células Vero 118 y la infectividad viral se cuantificó midiendo la cantidad de antígeno viral producido a las 48 horas representada como el porcentaje del valor obtenido en ausencia de Acs.

Estos resultados indican que igual que el AcM 54G10 dirigido frente al sitio antigénico 5-6 la proteína F del MNVH es capaz de neutralizar la infectividad del VRSH, el AcM 101F que va dirigido frente al sitio antigénico IV de la proteína F del VRSH es capaz de neutralizar la infectividad del MNVH. Ambos se unen a epítomos que se encuentran en regiones homólogas de las proteínas F del MNVH y del VRSH. Como se discutirá más adelante, es probable que la cross-neutralización se deba a la similitud de secuencia aminoacídica de las proteínas F de ambos virus en esta zona.

Por otro lado, se examinó si en las preparaciones de Acs policlonales obtenidas mediante la inmunización de conejos con los virus vaccinia que expresaban distintas construcciones de las proteínas F del MNVH y del VRSH (α -vv_Fc y α -vv_F_{TM}⁻) había Acs con capacidad cros-neutralizante. Para ello, diluciones seriadas de cada preparación de Acs se enfrentaron con una cantidad fija de los virus MNVH_gfp_B1 y VRSH_long y se incubaron durante 48 horas o 72 horas respectivamente a 37°C. La capacidad neutralizante en ambos casos se evaluó en función de la disminución en la producción de antígeno viral mediante ELISA.

Como se observa en la Figura 34-A, la infectividad del **MNVH** únicamente fue neutralizada por los Acs obtenidos a partir de la inmunización con los virus vaccinia que expresaban las construcciones de su proteína F (α -vv_Fc_MNVH y α -vv_F_{TM}⁻_MNVH). En las preparaciones de Acs anti proteína F del VRSH no había Acs con capacidad de neutralizar la infección por el MNVH, incluso con las cantidades más altas de Acs utilizadas.

Para el **VRSH** el resultado obtenido fue el mismo ya que únicamente los Acs α -vv_Fc_VRSH y α -vv_F_{TM}-VRSH tuvieron capacidad para neutralizar la infectividad viral (Figura 34-B). La producción de antígeno viral no disminuyó a ninguna de las diluciones de los Acs anti proteína F del MNVH utilizadas.

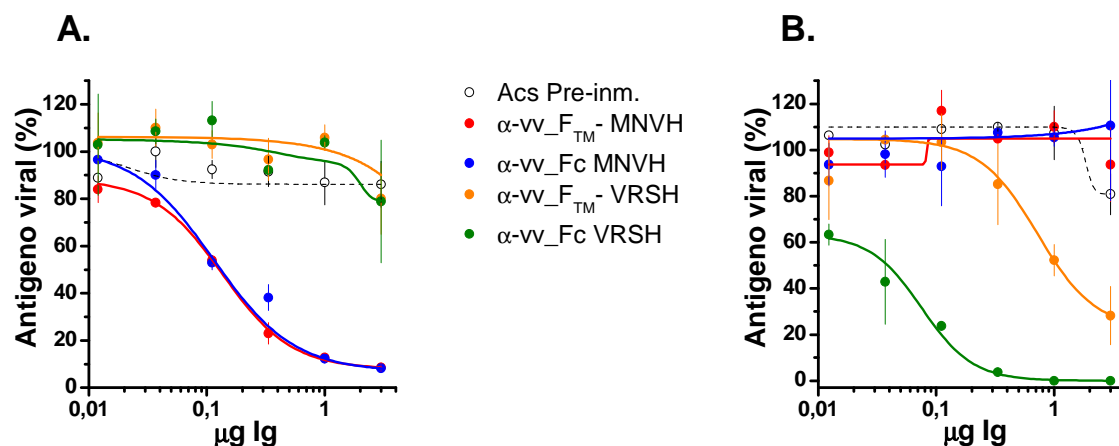


Figura 34. Análisis de la capacidad neutralizante de los Acs obtenidos a partir de los sueros policlonales de conejos inmunizados con los virus vaccinia recombinantes indicados. Diluciones seriadas de las preparaciones de Acs se incubaron con una cantidad fija de cada uno de los virus durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla se utilizó para infectar células Vero-118 (MNVH) o HEp-2 (VRSH) y la infectividad viral se cuantificó midiendo la cantidad de antígeno viral producido a las 48 horas (MNVH) o 72 horas (VRSH) representada como el porcentaje del valor obtenido en ausencia de Acs.

Por tanto, en la respuesta policlonal inducida en conejos inmunizados con virus vaccinia que expresan la forma completa (vv_Fc) o una forma soluble (vv_F_{TM}-) de la proteína F del MNVH o las proteínas F equivalentes del VRSH únicamente se producen Acs con capacidad de neutralizar la infección del virus que posee la proteína F homóloga, es decir, no existen anticuerpos con capacidad cros-neutralizante.

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

1. Obtención de anticuerpos específicos de la forma post-fusión de la proteína F del MNVH

En esta Tesis se describe la obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales específicos del haz de seis α -hélices presente en la conformación post-fusión de la proteína F del MNVH, utilizando una estrategia similar a la empleada anteriormente en el laboratorio para la obtención de anticuerpos equivalentes frente a la proteína F del VRSH (Palomo et al., 2014). Es de resaltar que los anticuerpos α -6HB representan una fracción sustancial de los anticuerpos que se inducen en conejos con la proteína GST-HRA-L-HRB. Así, tras la depleción de anticuerpos que se unen a las proteínas individuales GST-RHA-L y GST-RHB, la reactividad de los anticuerpos α -6HB con la proteína GST-RHA-L-RHB era casi la misma que antes de la depleción. Es probable que esto se deba a la tendencia de las regiones RHA y RHB a ensamblarse espontáneamente en estructuras muy estables que asemejan el motivo de 6-HB (Lawless-Delmedico et al., 2000, Matthews et al., 2000, Miller et al., 2007, Zhao et al., 2000) y que esto facilite también la obtención de AcMs de esa misma especificidad.

Puesto que el haz de 6HB está presente en la forma post-fusión de la proteína F de todos los demás paramixovirus, la estrategia descrita en este trabajo podría utilizarse también para obtener anticuerpos específicos de la forma post-fusión de la proteína F de esos virus. Además, estructuras parecidas al haz de 6HB están presentes en las formas post-fusión de las denominadas proteínas de fusión tipo I. Estas proteínas forman parte de las partículas de virus de las familias *Filoviridae*, *Retroviridae*, *Arenavirinae*, *Orthomyxoviridae* y *Coronaviridae* y en todos los casos promueven la fusión de las membranas viral y celular (Igonet et al., 2012). Por tanto, estrategias parecidas a la descrita en esta Tesis se podrían aplicar para obtener anticuerpos específicos de la forma post-fusión de las proteínas de fusión tipo I. Estos anticuerpos pueden ser muy útiles para estudios estructurales de esas proteínas, como lo han sido para estudios de la proteína F del MNVH y de la proteína F del VRSH.

2. Optimización de la producción del ectodominio soluble de la proteína F del MNVH en su conformación post-fusión

La utilización de virus vaccinia (vv) como vector para la expresión de distintas construcciones de la proteína F del VRSH es un sistema ampliamente utilizado en nuestro laboratorio. Debido a la similitud entre las proteínas F del MNVH y F del VRSH, se decidió utilizar el mismo sistema para la expresión de la proteína F del MNVH. Inicialmente, la construcción F_{TM}-VRSH se diseñó para expresar el ectodominio soluble de la proteína F del VRSH que, como se vio posteriormente, se pliega espontáneamente en la conformación post-

fusión (Bembridge et al., 1999, Calder et al., 2000). El vv_{F_{TM}}_VRSH produce mayoritariamente una proteína trimérica y en menor cantidad una proteína monomérica. Esto se debe probablemente a que, al carecer de la región transmembrana, la trimerización de la proteína F_{TM}_VRSH es relativamente ineficiente. Esta ineficiencia en la trimerización se vio acrecentada particularmente en el caso de la proteína F_{TM}_MNVH, donde a partir del vv_{F_{TM}}_B1 el rendimiento en la obtención de trímero soluble en la conformación post-fusión fue extremadamente bajo, siendo el monómero la forma mayoritaria que se obtenía al finalizar la purificación de proteína.

La adición de dominios de oligomerización para estabilizar proteínas de fusión de los paramixovirus en forma trimérica es una práctica ampliamente utilizada (McLellan et al., 2013b, McLellan et al., 2013a, Wen et al., 2012, Yin et al., 2006). Por ello, para facilitar la trimerización de la proteína F_{TM}_B1, se le añadió el dominio de oligomerización “foldon” en el extremo C-terminal (Bhardwaj et al., 2008). A partir de la construcción F_{TM}_foldon_B1 se observó un aumento notable en la producción de proteína soluble en forma trimérica, tanto por el pico de elución en la cromatografía de filtración en gel como por los ensayos de entrecruzamiento con glutaraldehído (Tabla 5). Sin embargo, al observar la proteína F_{TM}_foldon_B1 al microscopio electrónico solo se vieron unas pocas moléculas individuales en forma de cono, correspondientes a la conformación post-fusión, mientras que la mayoría de las moléculas se habían disgregado en estructuras pequeñas y amorfas. Este resultado impedía llegar a una conclusión definitiva sobre la conformación adoptada por la proteína F_{TM}_foldon_B1 purificada.

Para aumentar la estabilidad de la proteína F_{TM}_foldon_B1 se indujo su procesamiento proteolítico mediante la adición de tripsina, ya que se ha observado que el procesamiento de la proteína F_{TM}_VRSH aumenta su estabilidad, reflejada en un cambio en la movilidad electroforética en SDS-PAGE, en condiciones no reductoras y sin calor, compatible con un trímero de proteína (Vicente Mas, comunicación personal). El tratamiento con tripsina de la proteína F_{TM}_foldon_B1 también indujo una mayor estabilidad de esta proteína, reflejada en la aparición al microscopio electrónico de moléculas de proteína aparentemente en su conformación post-fusión agregadas en rosetas por la parte final del tallo. La agregación en rosetas de la proteína así procesada es probablemente consecuencia de la exposición en la molécula de los péptidos de fusión, como se ha observado tras el corte proteolítico de la proteína F_{TM}_VRSH, lo que conduce a la unión de varios de ellos para evitar el ambiente hidrofóbico en el que está disuelta la proteína (Calder et al., 2000).

Con el fin de evitar la agregación de la proteína F soluble del MNVH en la conformación post-fusión se deleccionaron los nueve primeros aminoácidos del péptido de fusión

(Δ 103-111), como se había hecho previamente con la proteína F del VRSH soluble (Ruiz-Arguello et al., 2004). Además, para prescindir de la tripsina, se sustituyó el sitio de corte natural de la proteína F del MNVH (RQSR, residuos 99-102) por el sitio de corte II de la proteína F del VRSH (KKRKRR, residuos 131-136), que facilita el corte por proteasas celulares tipo furina. Estas modificaciones dieron lugar a la proteína $F_{TM^-}\Delta$ 103-111_KKRKRR_B1 cuyo análisis al microscopio electrónico reveló la presencia de moléculas individuales de proteína con la forma de cono característica de la conformación post-fusión. Además, el estado post-fusión de la proteína $F_{TM^-}\Delta$ 103-111_KKRKRR_B1 se corroboró por su reactividad con los AcMs α -6HB.

Cuando los cambios introducidos en la proteína $F_{TM^-}\Delta$ 103-111_KKRKRR_B1 se introdujeron en la proteína F de la cepa NL/1/00 (sublinaje A1), la proteína así modificada también se expresó a partir de virus vaccinia recombinantes como un trímero soluble que reaccionaba con los AcMs α -6HB y al microscopio electrónico tenía el típico aspecto de cono característico de la conformación post-fusión. En ambas proteínas se comprobó que la presencia del dominio “foldon” era necesaria para la trimerización solo durante el proceso de síntesis ya que al trímero purificado se le podía eliminar ese dominio sin que la proteína cambiase sustancialmente su estado de oligomerización y su estabilidad (datos no mostrados).

En conclusión, para la obtención de un trímero soluble estable de las proteínas F del MNVH de los sublinajes A1 y B1 en la conformación post-fusión fue necesario: 1) añadir un dominio de trimerización (foldon) para suplir la deficiencia de la región transmembrana y facilitar la trimerización de la proteína durante el proceso de síntesis, 2) inducir el procesamiento de la misma para obtener una molécula con mayor estabilidad y 3) eliminar los nueve primeros aminoácidos hidrofóbicos del péptido de fusión para evitar la agregación. El procesamiento proteolítico completo de la proteína F así modificado requiere la sobreexpresión de furina dentro de la célula, lo cual se consiguió co-infectando con un virus vaccinia que expresa dicha proteasa en grandes cantidades.

3. Comparación de los anticuerpos neutralizantes dirigidos frente a formas solubles y completas de las proteínas F del MNVH y del VRSH expresadas a partir de virus vaccinia recombinantes

Trabajos previos del laboratorio habían puesto de manifiesto que la inmunización de conejos con virus vaccinia que expresaban la forma completa de la proteína F del VRSH (vv_Fc) o una forma soluble (vv_ F_{TM^-}) de la misma, inducían distintos tipos de anticuerpos (Acs) neutralizantes (Magro et al., 2012). La inmunización con vv_ F_{TM^-} inducía Acs neutralizantes que solo reconocían epítomos representados en la conformación post-fusión de la proteína F del VRSH (F_{TM^-}), aunque probablemente esos epítomos eran compartidos con la forma pre-fusión

de la misma proteína. Por el contrario, la mayor parte de los Acs neutralizantes inducidos por el vv_Fc reconocían epítomos que no estaban representados en la conformación post-fusión de la proteína F del VRSH y que probablemente eran exclusivos de la conformación pre-fusión de esa proteína.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se inmunizaron conejos con virus vaccinia que expresaban una forma completa (vv_Fc) o una forma soluble (vv_F_{TM}⁻) de la proteína F del MNVH. En ambos casos se obtuvieron Acs que reconocían a la proteína F_{TM}⁻ del MNVH en ELISA y que inhibían la infectividad del virus en ensayos de microneutralización.

Para determinar si los Acs así obtenidos reconocían epítomos que no estaban presentes en la forma post-fusión de la proteína F del MNVH, de ambas preparaciones se eliminaron los anticuerpos que sí la reconocían utilizando una columna de Sepharosa que tenía unida covalentemente la proteína F_{TM}⁻ Δ 103-111_KKRKRR_B1. Esta metodología se había utilizado anteriormente en el laboratorio para fraccionar los Acs α -F del VRSH inducidos en conejos inmunizados con los virus vaccinia recombinantes mencionados anteriormente. Por ello, se llevaron a cabo en paralelo procesos de fraccionamiento y análisis de los Acs inducidos en conejos mediante la inmunización con virus vaccinia que expresaban formas completas (Fc) o solubles (F_{TM}⁻) de las proteínas F del MNVH y F del VRSH.

Los Acs inducidos por los virus vaccinia que expresaban las formas solubles (F_{TM}⁻) de las proteínas F de ambos virus tenían propiedades parecidas. Así, tras la depleción con las columnas de Sepharosa-F_{TM}⁻, la fracción de Acs no retenidos en las columnas había perdido toda la capacidad neutralizante, que ahora se encontraba en la fracción de Acs eluidos de las columnas. Es decir, en ambos casos los Acs inducidos frente a la proteína F soluble aparentemente reconocían solo epítomos que se encontraban representados en la conformación post-fusión de las respectivas proteínas F.

Por el contrario, los Acs α -F inducidos por los virus vaccinia que expresaban las proteínas Fc del MNVH o del VRSH tuvieron comportamientos muy distintos en los procesos de fraccionamiento antes aludidos. Así, mientras los Acs neutralizantes inducidos frente a la proteína F del MNVH eran retenidos totalmente en la columna de Sepharosa-F_{TM}⁻ de este virus, la mayor parte de los Acs neutralizantes dirigidos frente a la proteína F del VRSH estaban en la fracción no retenida en la columna de proteína F_{TM}⁻ equivalente, tal como se había descrito previamente (Magro et al., 2012). Esta es una diferencia inmunogénica muy significativa entre dos proteínas que tienen muchas analogías estructurales y que provienen de dos virus muy parecidos dentro de la subfamilia *Pneumovirinae*.

La depleción de Acs específicos de la conformación pre-fusión de la proteína F no es posible llevarla a cabo en el caso del MNVH, puesto que no se dispone de una construcción de esta proteína estabilizada en la conformación pre-fusión. Sin embargo, se dispone de formas monoméricas tanto de la proteína F del MNVH, descrita en esta Tesis, como de la proteína F del VRSH. Puesto que se ha descrito que la forma monomérica de la proteína F del VRSH es reconocida por Acs neutralizantes específicos de la conformación pre-fusión de dicha proteína (Swanson et al., 2014), se decidió abordar la depleción de los Acs α -monómero de las preparaciones α -vv_Fc de ambos virus como alternativa para identificar posibles Acs específicos de la conformación pre-fusión de las respectivas proteínas.

Los resultados obtenidos demostraron que los Acs neutralizantes α -F inducidos por el vv_Fc del VRSH quedaban retenidos en la columna que tenía inmovilizada la forma monomérica de la proteína F de este virus. Puesto que la mayor parte de la actividad neutralizante de esos Acs no se retenía en la columna de Sepharosa-F_{TM}⁻, la conclusión más probable es que esos anticuerpos reconocen epítomos específicos de la forma pre-fusión que están preservados en el monómero de la proteína F del VRSH. De igual manera, los Acs neutralizantes inducidos por el vv_Fc del MNVH quedaron retenidos en la columna de monómero de esa proteína, reforzando la conclusión de que los epítomos que reconocen esos Acs en la conformación post-fusión de la proteína F probablemente están presentes también en la conformación pre-fusión de la misma proteína, teniendo por ello esos anticuerpos capacidad de neutralizar la infectividad del MNVH.

4. Comparación de anticuerpos dirigidos frente a las proteínas F del MNVH y del VRSH presentes en una preparación de inmunoglobulinas humanas

RespiGam (RG) es una preparación de inmunoglobulinas (Igs) humanas obtenida a partir de plasma de donantes seleccionados por tener una elevada capacidad neutralizante frente al VRSH. Estudios previos demostraron que una gran parte de esos Acs neutralizantes reconocían epítomos que no estaban representados en la conformación post-fusión de la proteína F del VRSH (Magro et al., 2012, Sastre et al., 2004). RG mostró también una capacidad neutralizante frente al MNVH. Por ello, el RG se sometió a los mismos métodos de fraccionamiento descritos en el apartado anterior con las columnas de Sepharosa-F_{TM}⁻ y Sepharosa-Mon provenientes tanto de la proteína F del MNVH como de la proteína F del VRSH.

Los resultados obtenidos mimetizaron los obtenidos con los sueros de los conejos inmunizados con vv_Fc. Así, mientras que la depleción de RG con columnas de Sepharosa-Mon del VRSH eliminaba la mayor parte de los Acs neutralizantes frente a este virus, la depleción de RG con columnas de Sepharosa-F_{TM}⁻ tenía un efecto mínimo en la eliminación de

Acs neutralizantes. Sin embargo, la depleción de RG con columnas de Sepharosa que tenían inmovilizada tanto proteína F_{TM} como el monómero de la proteína F del MNVH eliminaba la mayor parte de la actividad neutralizante. Por tanto, los Acs neutralizantes α -F presentes en sueros de conejo inmunizados con vv_Fc y en sueros humanos, que probablemente se han inducido tras infecciones naturales, tienen características similares. Estos resultados apoyan el uso de proteína Fc, expresada a partir de virus vaccinia u otros vectores, como inmunógeno para la inducción de Acs que mimetizan en gran medida los que se inducen tras una infección natural en humanos.

5. Cros-reactividad y cros-neutralización entre anticuerpos dirigidos frente a las proteínas F del MNVH y del VRSH

En la introducción se ha mencionado que las proteínas F del MNVH y del VRSH tienen un 33% de identidad global de secuencia aminoacídica. Por ello, varios grupos han buscado anticuerpos con capacidad de neutralizar ambos virus. Corti y colaboradores aislaron un anticuerpo monoclonal (AcM) humano dirigido frente a la proteína F del VRSH, denominado MPE8 con capacidad neutralizante “in vitro” y profiláctica en modelos animales frente a infecciones por el VRSH, el MNVH y otros *Pneumovirus* (Corti et al., 2013). Estos autores observaron que el MPE8 se unía a un nuevo sitio antigénico, no identificado hasta el momento y exclusivo de la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH. Schuster y colaboradores aislaron el AcM humano 54G10 que mostró tener capacidad profiláctica y terapéutica frente a infecciones por el MNVH y el VRSH en modelos de ratón (Schuster et al., 2014). Mediante el aislamiento de mutantes de escape, estos autores demostraron que el AcM 54G10 se une a la proteína F del MNVH en el sitio antigénico 5/6 y propusieron que ese mismo anticuerpo se uniría al sitio antigénico IV de la proteína F del VRSH debido a la similitud en la localización de ambos sitios antigénicos en las proteínas F de los respectivos virus (Figura 11 del apartado introducción).

Puesto que en nuestro laboratorio se dispone de una amplia batería de AcMs dirigidos frente a distintos sitios antigénicos de la proteína F del VRSH, y en particular frente al sitio antigénico IV, se probó la capacidad de esos AcMs para unirse a la proteína F del MNVH en ELISA. Así, se pudo comprobar que el AcM 101F, y en menor medida el AcM 105F eran capaces de unirse a formas solubles F_{TM}- Δ 103-111_KKRKRR de las cepas A1 y B1 del MNVH. Puesto que ambos AcMs neutralizan la infectividad del VRSH, se probó su capacidad neutralizante frente a las dos cepas del MNVH, observándose que únicamente el AcM 101F era capaz de neutralizar la infectividad de los virus de ambos sublinajes.

Puesto que determinados AcMs habían demostrado ser capaces de cros-neutralizar cepas del MNVH y del VRSH se examinó si en las preparaciones de anticuerpos policlonales, obtenidas mediante la inmunización de conejos con virus vaccinia que expresaban distintas construcciones de las proteínas F del MNVH y F del VRSH (vv_Fc y vv_F_{TM}-) había anticuerpos con capacidad de neutralizar ambos virus. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que tanto el MNVH como el VRSH son neutralizados únicamente por los anticuerpos dirigidos frente a su propia proteína F. Anteriormente otro grupo había infectado “cotton rats” con el MNVH o con el VRSH para comprobar si en una infección natural se inducían anticuerpos con capacidad cros-neutralizante. Ensayos de neutralización “in vitro” con los sueros post-infección pusieron de manifiesto que tanto el MNVH como el VRSH únicamente eran neutralizados por el suero obtenido tras la infección con el virus homólogo (Wyde et al., 2003). Tomando todos estos resultados en conjunto se puede concluir que aunque existen Acs individuales dirigidos frente a las proteínas F del MNVH y F del VRSH que tienen capacidad de neutralizar ambos virus, estos Acs no están presentes o son muy minoritarios en una respuesta policlonal de anticuerpos inducida por virus vaccinia que expresan distintas construcciones de la proteína F del MNVH y F del VRSH, o en una respuesta policlonal tras una infección por los virus. Es de resaltar, sin embargo, que el AcM cros-neutralizante 101F se obtuvo a partir de esplenocitos de un ratón inmunizado con un virus vaccinia que expresaba la proteína Fc del VRSH.

Actualmente no existen vacunas frente a ninguno de los dos virus. Únicamente existe un tratamiento profiláctico frente al VRSH basado en la administración del anticuerpo monoclonal Palivizumab. Puesto que se ha visto que hay AcMs dirigidos frente al sitio antigénico 5 de la proteína F del MNVH y frente al sitio IV de la proteína F del VRSH que tienen capacidad de neutralizar ambos virus, una mezcla de AcMs dirigidos frente a estos sitios antigénicos podría ser un buen tratamiento profiláctico en personas de riesgo para prevenir la infección por ambos virus respiratorios.

6. Comparación de las estructuras antigénicas de las proteínas F del VRSH y del MNVH

La disponibilidad de las estructuras atómicas de la proteína F del VRSH en las conformaciones pre- y post-fusión ha hecho posible la localización de los epítomos en la estructura de la proteína F a los que se unen anticuerpos neutralizantes (Figura 35). En el caso de la proteína F del MNVH, para la localización de estos epítomos ha sido necesario generar modelos de la proteína F en ambas conformaciones. El modelo de la proteína F en su conformación pre-fusión está basado en la estructura parcial disponible de un monómero formando un inmunocomplejo con el Fab del AcM DS7 (Wen et al., 2012) (Figura 35). Por otro lado, el modelo de la proteína F del MNVH en su conformación post-fusión está basado en la

estructura atómica de la proteína F del VRSH en dicha conformación. Datos de microscopía electrónica obtenidos durante este trabajo de las proteínas F solubles del MNVH en la conformación post-fusión apoyan este modelo (Figura 35).

La localización de los epítomos (identificados mediante aislamiento de mutantes resistentes o formación de complejos proteína-Fab de AcMs) en las estructuras de la proteína F del VRSH y modelos de la proteína F del MNVH es muy similar. En ambos casos se aprecia la presencia de 5 sitios antigénicos solapantes (sitios 0, II, III, IV, V de la F del HRSV y sitios 2, 3, III, 4, 5-6 de la F del HMPV). Además, se observan los epítomos I y 7 no solapantes localizados en la región globular de las proteínas F del VRSH y MNVH, respectivamente.

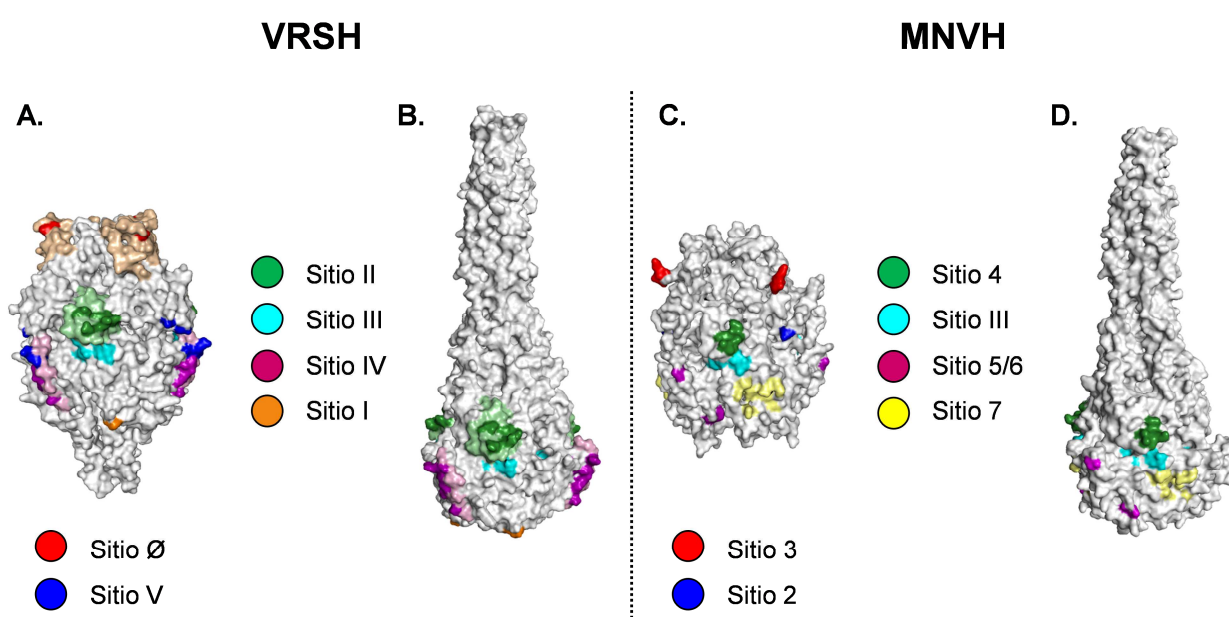


Figura 35. Localización de los sitios antigénicos en las estructuras de la proteína F del VRSH en las conformaciones pre- y post-fusión y en los modelos de la proteína del MNVH en dichas conformaciones. **A y B.** Estructuras de la proteína F del VRSH en la conformación pre- (código PDB 4MMV) y post-fusión (código PDB 3RRR), respectivamente. En ambas estructuras y para cada sitio antigénico, los colores intensos indican los residuos identificados mediante aislamiento de mutantes resistentes o ensayos de binding con mutantes, y los colores suaves resaltan la huella de interacción de los anticuerpos tras la co-cristalización del Fab de los mismos con la proteína F. Los sitios antigénicos Ø y V (rojo y azul respectivamente) son exclusivos de la conformación pre-fusión de la proteína F del VRSH. Los sitios antigénicos I, II, III, y IV (naranja, verde, azul celeste y magenta) son compartidos por las conformaciones pre- y post-fusión de la proteína F del VRSH. **C y D.** Modelos de las estructuras de la proteína F del MNVH en las conformaciones pre- y post-fusión respectivamente. En ambos modelos, todos los sitios antigénicos excepto el sitio 7 se han mapeado mediante la obtención de mutantes resistentes a la neutralización por AcMs o ensayos de binding con mutantes. La localización del sitio antigénico 7 se obtuvo gracias a la huella de interacción del del Fab del anticuerpo DS7 con la proteína F. Los sitios antigénicos 2 y 3 (azul y rojo, respectivamente) son exclusivos de la conformación pre-fusión de la proteína F del MNVH. Los sitios antigénicos 4, III, 5/6 y 7 (verde, azul celeste, magenta y amarillo) son compartidos por las conformaciones pre- y post-fusión de la proteína F del MNVH.

En el caso del VRSH, ensayos de “binding” de AcMs con las proteínas F revelan que los sitios antigénicos I, II, III y IV están presentes en las conformaciones pre- y post-fusión

(Figura 35). Es fácil pensar un comportamiento similar de los sitios análogos (III, 4, 5-6) en la estructura de la proteína F del MNVH. Por otro lado, ensayos de microscopía electrónica con el Fab del sitio 7 revelaron que este sitio se localiza también en ambas conformaciones de la F del MNVH. La presencia de todos estos epítomos en ambas conformaciones explicaría por qué anticuerpos que reconocen a las proteínas en las conformaciones post-fusión (retenidos por las columnas de Sepharosa- F_{TM^-}) tienen capacidad de neutralizar la infectividad de ambos virus en ensayos de microneutralización “in vitro”.

En la proteína F del VRSH se han descrito recientemente los sitios antigénicos \emptyset y V que se encuentran exclusivamente en la conformación pre-fusión de la misma (Figura 35). Los AcMs que se unen a estos sitios tienen mayor capacidad neutralizante que los AcMs que se unen al resto de sitios antigénicos presentes en ambas conformaciones. Dada la localización análoga de los sitios antigénicos 3 y 2 en la proteína F del MNVH es de suponer que los AcMs neutralizantes dirigidos frente a estos sitios antigénicos son específicos de la conformación pre-fusión.

Teniendo en cuenta toda la información disponible en referencia a la localización de los sitios antigénicos en la estructura de la proteína F del VRSH, era esperable que del mismo modo a lo observado con el VRSH, en la respuesta policlonal en conejos inmunizados con un virus vaccinia que expresaba la forma completa de la proteína F del MNVH así como en una respuesta policlonal humana inducida por una infección natural por el MNVH, se indujeran Acs neutralizantes que diferenciaran entre las conformaciones pre- y/o post-fusión de la proteína F del MNVH. En cambio, como se ha discutido en los apartados 3 y 4 de esta sección, en ninguna de las preparaciones de Acs se detectaron Acs neutralizantes que no reconocieran a la proteína F en la conformación post-fusión (F_{TM^-}), es decir, no se hallaron AcM neutralizantes que reconocieran epítomos exclusivos de la conformación pre-fusión de la proteína F del MNVH.

Una hipótesis que podría explicar estos resultados estaría relacionada con una menor estabilidad de la proteína F del MNVH en comparación con la proteína F del VRSH. En la partícula viral, así como en la membrana de células que expresan la forma completa de la proteína F del MNVH, la mayoría de las moléculas estarían en la conformación post-fusión por lo que el sistema inmune induciría la producción de Acs frente a esta conformación mayoritaria, seleccionándose por ello los Acs neutralizantes que reconocen a la proteína F del MNVH en las conformaciones pre- y post-fusión.

Por todo lo dicho y a diferencia de lo descrito para el VRSH, una vacuna basada en una proteína F del MNVH estabilizada en la conformación post-fusión sería suficiente para inducir la respuesta inmune que se genera en infecciones naturales.

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1. Los anticuerpos dirigidos frente al dominio de 6HB de la proteína F del MNVH son una herramienta muy útil para caracterizar la conformación de distintas construcciones de la proteína F.
2. La obtención de una proteína F soluble trimérica del MNVH en la conformación post-fusión requiere de modificaciones para estabilizar la proteína que no fueron necesarias en el caso de la proteína F del VRSH: 1) adición del dominio de oligomerización foldon, 2) delección de los nueve primeros aminoácidos del péptido de fusión y 3) sustitución del sitio de corte natural por el sitio II del VRSH.
3. La inmunización de conejos con virus vaccinia que expresan una forma soluble de la proteína F del MNVH induce únicamente anticuerpos neutralizantes que reconocen epítomos presentes en la conformación post-fusión de la proteína como sucede en el caso del VRSH.
4. Los anticuerpos neutralizantes inducidos mediante la inmunización de conejos con virus vaccinia que expresan la forma completa de la proteína F del MNVH únicamente reconocen epítomos presentes en la conformación post-fusión de la proteína a diferencia a lo observado con el VRSH.
5. En la preparación de inmunoglobulinas humanas RespiGam los anticuerpos neutralizantes detectados frente a la proteína F del MNVH reconocen solamente epítomos presentes en la conformación post-fusión de la proteína F y que probablemente sean compartidos con la conformación pre-fusión de dicha proteína.
6. El monómero de la proteína F del MNVH exhibe epítomos a los que se unen anticuerpos neutralizantes.
7. El anticuerpo monoclonal murino 101F dirigido frente al sitio antigénico IV de la proteína F del VRSH tiene capacidad cros-neutralizante con cepas representativas de los sublinajes A1 y B1 del MNVH.
8. La inmunización de conejos con virus vaccinia que expresan una forma soluble o las formas completas de las proteínas F del MNVH y del VRSH no inducen anticuerpos con capacidad cros-neutralizante.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Alvarez, R., K. S. Harrod, W. J. Shieh, S. Zaki, and R. A. Tripp. 2004. Human metapneumovirus persists in BALB/c mice despite the presence of neutralizing antibodies. *J Virol* 78:14003-14011.

Arbiza, J., G. Taylor, J. A. Lopez, J. Furze, S. Wyld, P. Whyte, E. J. Stott, G. Wertz, W. Sullender, M. Trudel, and J. A. Melero. 1992. Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 73 (Pt 9):2225-2234.

Arnold, J. C., K. K. Singh, E. Milder, S. A. Spector, M. H. Sawyer, S. Gavali, and C. Glaser. 2009. Human metapneumovirus associated with central nervous system infection in children. *Pediatr Infect. Dis J* 28:1057-1060.

Bao, X., T. Liu, Y. Shan, K. Li, R. P. Garofalo, and A. Casola. 2008. Human metapneumovirus glycoprotein G inhibits innate immune responses. *PLoS. Pathog.* 4:e1000077.

Beeler, J. A. and C. K. Van Wyke. 1989. Neutralization epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus: effect of mutation upon fusion function. *J Virol* 63:2941-2950.

Bellau-Pujol, S., A. Vabret, L. Legrand, J. Dina, S. Gouarin, J. Petitjean-Lecherbonnier, B. Pozzetto, C. Ginevra, and F. Freymuth. 2005. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J. Virol. Methods* 126:53-63.

Bembridge, G. P., J. A. Lopez, R. Bustos, J. A. Melero, R. Cook, H. Mason, and G. Taylor. 1999. Priming with a secreted form of the fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV) promotes interleukin-4 (IL-4) and IL-5 production but not pulmonary eosinophilia following RSV challenge. *J. Virol.* 73:10086-10094.

Bhardwaj, A., N. Walker-Kopp, S. Wilkens, and G. Cingolani. 2008. Foldon-guided self-assembly of ultra-stable protein fibers. *Protein Sci.* 17:1475-1485.

Biacchesi, S., B. R. Murphy, P. L. Collins, and U. J. Buchholz. 2007. Frequent frameshift and point mutations in the SH gene of human metapneumovirus passaged in vitro. *J Virol* 81:6057-6067.

Biacchesi, S., Q. N. Pham, M. H. Skiadopoulos, B. R. Murphy, P. L. Collins, and U. J. Buchholz. 2005. Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. *J Virol* 79:12608-12613.

Biacchesi, S., M. H. Skiadopoulos, G. Boivin, C. T. Hanson, B. R. Murphy, P. L. Collins, and U. J. Buchholz. 2003. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology* 315:1-9.

Biacchesi, S., M. H. Skiadopoulos, L. Yang, E. W. Lamirande, K. C. Tran, B. R. Murphy, P. L. Collins, and U. J. Buchholz. 2004. Recombinant human Metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate. *J Virol* 78:12877-12887.

Blasco, R. and B. Moss. 1995. Selection of recombinant vaccinia viruses on the basis of plaque formation. *Gene* 158:157-162.

Boivin, G., Y. Abed, G. Pelletier, L. Ruel, D. Moisan, S. Cote, T. C. Peret, D. D. Erdman, and L. J. Anderson. 2002. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect. Dis* 186:1330-1334.

Buchholz, U. J., S. Biacchesi, Q. N. Pham, K. C. Tran, L. Yang, C. L. Luongo, M. H. Skiadopoulos, B. R. Murphy, and P. L. Collins. 2005. Deletion of M2 gene open reading frames 1 and 2 of human metapneumovirus: effects on RNA synthesis, attenuation, and immunogenicity. *J Virol* 79:6588-6597.

Calder, L. J., L. Gonzalez-Reyes, B. Garcia-Barreno, S. A. Wharton, J. J. Skehel, D. C. Wiley, and J. A. Melero. 2000. Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. *Virology* 271:122-131.

Castagne, N., A. Barbier, J. Bernard, H. Rezaei, J. C. Huet, C. Henry, B. Da Costa, and J. F. Eleouet. 2004. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization domain. *J Gen Virol* 85:1643-1653.

Cespedes, P. F., P. A. Gonzalez, and A. M. Kalergis. 2013. Human metapneumovirus keeps dendritic cells from priming antigen-specific naive T cells. *Immunology* 139:366-376.

Chang, A., C. Masante, U. J. Buchholz, and R. E. Dutch. 2012. Human metapneumovirus (HMPV) binding and infection are mediated by interactions between the HMPV fusion protein and heparan sulfate. *J Virol* 86:3230-3243.

Choi, E. H., H. J. Lee, S. J. Kim, B. W. Eun, N. H. Kim, J. A. Lee, J. H. Lee, E. K. Song, S. H. Kim, J. Y. Park, and J. Y. Sung. 2006. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. *Clin Infect. Dis* 43:585-592.

Collins, P. L., M. G. Hill, E. Camargo, H. Grosfeld, R. M. Chanock, and B. R. Murphy. 1995. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* 92:11563-11567.

Collins, P. L., M. G. Hill, J. Cristina, and H. Grosfeld. 1996. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* 93:81-85.

Collins, P. L. and R. A. Karron. 2013. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus, pp. 1083-1123 *In David M.Knipe and Peter M.Howley [eds.]*, Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Corti, D., S. Bianchi, F. Vanzetta, A. Minola, L. Perez, G. Agatic, B. Guarino, C. Silacci, J. Marcandalli, B. J. Marsland, A. Piralla, E. Percivalle, F. Sallusto, F. Baldanti, and A. Lanzavecchia. 2013. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature* 501:439-443.

Cox, R. G., S. B. Livesay, M. Johnson, M. D. Ohi, and J. V. Williams. 2012. The human metapneumovirus fusion protein mediates entry via an interaction with RGD-binding integrins. *J. Virol.* 86:12148-12160.

Cox, R. G. and J. V. Williams. 2013. Breaking in: human metapneumovirus fusion and entry. *Viruses.* 5:192-210.

Crowe, J. E., Jr. 2001. Influence of maternal antibodies on neonatal immunization against respiratory viruses. *Clin. Infect. Dis.* 33:1720-1727.

Cseke, G., M. S. Maginnis, R. G. Cox, S. J. Tollefson, A. B. Podsiad, D. W. Wright, T. S. Dermody, and J. V. Williams. 2009. Integrin alphavbeta1 promotes infection by human metapneumovirus. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* 106:1566-1571.

Cseke, G., D. W. Wright, S. J. Tollefson, J. E. Johnson, J. E. Crowe, Jr., and J. V. Williams. 2007. Human metapneumovirus fusion protein vaccines that are immunogenic and protective in cotton rats. *J Virol* 81:698-707.

Dupuy, L. C., S. Dobson, V. Bitko, and S. Barik. 1999. Casein kinase 2-mediated phosphorylation of respiratory syncytial virus phosphoprotein P is essential for the transcription elongation activity of the viral polymerase; phosphorylation by casein kinase 1 occurs mainly at Ser(215) and is without effect. *J. Virol.* 73:8384-8392.

Freihorst, J. and P. L. Ogra. 2001. Mucosal immunity and viral infections. *Ann. Med.* 33:172-177.

Fuerst, T. R., E. G. Niles, F. W. Studier, and B. Moss. 1986. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83:8122-8126.

Garcia-Barreno, B., T. Delgado, and J. A. Melero. 1996. Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. *J Virol* 70:801-808.

Garcia-Barreno, B., C. Palomo, C. Penas, T. Delgado, P. Perez-Brena, and J. A. Melero. 1989. Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J Virol* 63:925-932.

Ghildyal, R., J. Mills, M. Murray, N. Vardaxis, and J. Meanger. 2002. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *J Gen Virol* 83:753-757.

Gonzalez-Reyes, L., M. B. Ruiz-Arguello, B. Garcia-Barreno, L. Calder, J. A. Lopez, J. P. Albar, J. J. Skehel, D. C. Wiley, and J. A. Melero. 2001. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* 98:9859-9864.

Hallak, L. K., S. A. Kwilas, and M. E. Peeples. 2007. Interaction between respiratory syncytial virus and glycosaminoglycans, including heparan sulfate. *Methods Mol. Biol.* 379:15-34.

Hamelin, M. E., C. Gagnon, G. A. Prince, P. Kiener, J. Suzich, N. Ulbrandt, and G. Boivin. 2010. Prophylactic and therapeutic benefits of a monoclonal antibody against the fusion protein of human metapneumovirus in a mouse model. *Antiviral Res* 88:31-37.

Hamelin, M. E., G. A. Prince, and G. Boivin. 2006. Effect of ribavirin and glucocorticoid treatment in a mouse model of human metapneumovirus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:774-777.

Hardy, R. W., S. B. Harmon, and G. W. Wertz. 1999. Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. *J Virol* 73:170-176.

Henderson, G., J. Murray, and R. P. Yeo. 2002. Sorting of the respiratory syncytial virus matrix protein into detergent-resistant structures is dependent on cell-surface expression of the glycoproteins. *Virology* 300:244-254.

Herfst, S., M. de Graaf, J. H. Schickli, R. S. Tang, J. Kaur, C. F. Yang, R. R. Spaete, A. A. Haller, B. G. van den Hoogen, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier. 2004. Recovery of human metapneumovirus genetic lineages A and B from cloned cDNA. *J Virol* 78:8264-8270.

Herfst, S., M. de Graaf, E. J. Schrauwen, N. D. Ulbrandt, A. S. Barnes, K. Senthil, A. D. Osterhaus, R. A. Fouchier, and B. G. van den Hoogen. 2007. Immunization of Syrian golden hamsters with F subunit vaccine of human metapneumovirus induces protection against challenge with homologous or heterologous strains. *J Gen Virol* 88:2702-2709.

Herfst, S. and R. A. Fouchier. 2008a. Vaccination approaches to combat human metapneumovirus lower respiratory tract infections. *J Clin Virol* 41:49-52.

Herfst, S., V. Mas, L. S. Ver, R. J. Wierda, A. D. Osterhaus, R. A. Fouchier, and J. A. Melero. 2008b. Low-pH-induced membrane fusion mediated by human metapneumovirus F protein is a rare, strain-dependent phenomenon. *J Virol* 82:8891-8895.

Herfst, S., E. J. Schrauwen, M. de Graaf, G. van Amerongen, B. G. van den Hoogen, R. L. de Swart, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier. 2008c. Immunogenicity and efficacy of two candidate human metapneumovirus vaccines in cynomolgus macaques. *Vaccine* 26:4224-4230.

Huck, B., G. Scharf, D. Neumann-Haefelin, W. Puppe, J. Weigl, and V. Falcone. 2006. Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerg. Infect. Dis* 12:147-150.

- Igonet, S. and F. A. Rey. 2012.** SnapShot: Viral and eukaryotic protein fusogens. *Cell* 151:1634.
- Kahn, J. S. 2006.** Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol. Rev* 19:546-557.
- Karron, R. A., D. A. Buonagurio, A. F. Georgiu, S. S. Whitehead, J. E. Adamus, M. L. Clements-Mann, D. O. Harris, V. B. Randolph, S. A. Udem, B. R. Murphy, and M. S. Sidhu. 1997.** Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* 94:13961-13966.
- Kitanovski, L., S. Kopriva, M. Pokorn, M. B. Dolnicar, V. Rajic, M. Stefanovic, and J. Jazbec. 2013.** Treatment of severe human metapneumovirus (hMPV) pneumonia in an immunocompromised child with oral ribavirin and IVIG. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 35:e311-e313.
- Kolli, D., E. L. Bataki, L. Spetch, A. Guerrero-Plata, A. M. Jewell, P. A. Piedra, G. N. Milligan, R. P. Garofalo, and A. Casola. 2008.** T lymphocytes contribute to antiviral immunity and pathogenesis in experimental human metapneumovirus infection. *J Virol* 82:8560-8569.
- Kuo, L., H. Grosfeld, J. Cristina, M. G. Hill, and P. L. Collins. 1996.** Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *J Virol* 70:6892-6901.
- Laham, F. R., V. Israele, J. M. Casellas, A. M. Garcia, C. M. Lac Prugent, S. J. Hoffman, D. Hauer, B. Thumar, M. I. Name, A. Pascual, N. Taratutto, M. T. Ishida, M. Balduzzi, M. Maccarone, S. Jackli, R. Passarino, R. A. Gaivironsky, R. A. Karron, N. R. Polack, and F. P. Polack. 2004.** Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. *J Infect. Dis* 189:2047-2056.
- Lamb, R. A. 1993.** Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology* 197:1-11.
- Lamb, R. A. and G. D. Parks. 2012.** Paramyxoviridae: The viruses and their replication, pp. 1449-1496 *In D. M. Knipe and P. M. Howley* [eds.], *Fields Virology*. Lippincott, Williams and Wilkins.
- Lamb, R. A. and G. D. Parks. 2013.** Paramyxoviridae, pp. 957-995 *In David M. Knipe and Peter M. Howley* [eds.], *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Lambert, D. M., S. Barney, A. L. Lambert, K. Guthrie, R. Medinas, D. E. Davis, T. Bucy, J. Erickson, G. Merutka, and S. R. Petteway, Jr. 1996.** Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:2186-2191.
- Lawless-Delmedico, M. K., P. Sista, R. Sen, N. C. Moore, J. B. Antczak, J. M. White, R. J. Greene, K. C. Leanza, T. J. Matthews, and D. M. Lambert. 2000.** Heptad-repeat

regions of respiratory syncytial virus F1 protein form a six-membered coiled-coil complex. *Biochemistry* 39:11684-11695.

Ling, R., P. J. Davis, Q. Yu, C. M. Wood, C. R. Pringle, D. Cavanagh, and A. J. Easton. 1995. Sequence and in vitro expression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus. *Virus Res.* 36:247-257.

Litwin, C. M. and J. G. Bosley. 2014. Seasonality and prevalence of respiratory pathogens detected by multiplex PCR at a tertiary care medical center. *Arch. Virol.* 159:65-72.

Liu, P., Z. Shu, X. Qin, Y. Dou, Y. Zhao, and X. Zhao. 2013. A live attenuated human metapneumovirus vaccine strain provides complete protection against homologous viral infection and cross-protection against heterologous viral infection in BALB/c mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 20:1246-1254.

Lopez, J. A., R. Bustos, C. Orvell, M. Berois, J. Arbiza, B. Garcia-Barreno, and J. A. Melero. 1998. Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J Virol* 72:6922-6928.

Magro, M., V. Mas, K. Chappell, M. Vazquez, O. Cano, D. Luque, M. C. Terron, J. A. Melero, and C. Palomo. 2012. Neutralizing antibodies against the preactive form of respiratory syncytial virus fusion protein offer unique possibilities for clinical intervention. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* 109:3089-3094.

Martinez, I., J. Dopazo, and J. A. Melero. 1997. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *J Gen Virol* 78 (Pt 10):2419-2429.

Martinez, I. and J. A. Melero. 2000. Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J Gen Virol* 81:2715-2722.

Mas, V., S. Herfst, A. D. Osterhaus, R. A. Fouchier, and J. A. Melero. 2011. Residues of the human metapneumovirus fusion (F) protein critical for its strain-related fusion phenotype: implications for the virus replication cycle. *J Virol* 85:12650-12661.

Masante, C., N. F. El, A. Chang, A. Jones, C. L. Moncman, and R. E. Dutch. 2014. The human metapneumovirus small hydrophobic protein has properties consistent with those of a viroporin and can modulate viral fusogenic activity. *J. Virol.* 88:6423-6433.

Matsuzaki, Y., K. Mizuta, E. Takashita, M. Okamoto, T. Itagaki, F. Katsushima, Y. Katsushima, Y. Nagai, and H. Nishimura. 2010. Comparison of virus isolation using the Vero E6 cell line with real-time RT-PCR assay for the detection of human metapneumovirus. *BMC Infect. Dis* 10:170.

Matthews, J. M., T. F. Young, S. P. Tucker, and J. P. Mackay. 2000. The core of the respiratory syncytial virus fusion protein is a trimeric coiled coil. *J Virol* 74:5911-5920.

McLellan, J. S., M. Chen, M. G. Joyce, M. Sastry, G. B. Stewart-Jones, Y. Yang, B. Zhang, L. Chen, S. Srivatsan, A. Zheng, T. Zhou, K. W. Graepel, A. Kumar, S. Moin, J. C. Boyington, G. Y. Chuang, C. Soto, U. Baxa, A. Q. Bakker, H. Spits, T. Beaumont, Z. Zheng, N. Xia, S. Y. Ko, J. P. Todd, S. Rao, B. S. Graham, and P. D.

Kwong. 2013a. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. *Science* 342:592-598.

McLellan, J. S., M. Chen, S. Leung, K. W. Graepel, X. Du, Y. Yang, T. Zhou, U. Baxa, E. Yasuda, T. Beaumont, A. Kumar, K. Modjarrad, Z. Zheng, M. Zhao, N. Xia, P. D. Kwong, and B. S. Graham. 2013b. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science* 340:1113-1117.

McLellan, J. S., Y. Yang, B. S. Graham, and P. D. Kwong. 2011. Structure of the Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein in the Post-fusion Conformation Reveals Preservation of Neutralizing Epitopes. *J Virol*.

Melero, J. A. and V. Mas. 2015. The Pneumovirinae fusion (F) protein: A common target for vaccines and antivirals. *Virus Res*.

Miller, S. A., S. Tollefson, J. E. Crowe, Jr., J. V. Williams, and D. W. Wright. 2007. Examination of a fusogenic hexameric core from human metapneumovirus and identification of a potent synthetic peptide inhibitor from the heptad repeat 1 region. *J Virol* 81:141-149.

Mink, M. A., D. S. Stec, and P. L. Collins. 1991. Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185:615-624.

Mok, H., S. J. Tollefson, A. B. Podsiad, B. E. Shepherd, V. V. Polosukhin, R. E. Johnston, J. V. Williams, and J. E. Crowe, Jr. 2008. An alphavirus replicon-based human metapneumovirus vaccine is immunogenic and protective in mice and cotton rats. *J. Virol.* 82:11410-11418.

Morrison, T. G. 1988. Structure, function, and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res* 10:113-135.

Palomo, C., V. Mas, M. Vazquez, O. Cano, D. Luque, M. C. Terron, L. J. Calder, and J. A. Melero. 2014. Polyclonal and monoclonal antibodies specific for the six-helix bundle of the human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein as probes of the protein post-fusion conformation. *Virology* 460-461:119-127.

Panda, S., N. K. Mohakud, L. Pena, and S. Kumar. 2014. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *Int. J. Infect. Dis.* 25:45-52.

Papenburg, J., J. Carbonneau, S. Isabel, M. G. Bergeron, J. V. Williams, S. G. De, M. E. Hamelin, and G. Boivin. 2013. Genetic diversity and molecular evolution of the major human metapneumovirus surface glycoproteins over a decade. *J. Clin. Virol.* 58:541-547.

Peret, T. C., G. Boivin, Y. Li, M. Couillard, C. Humphrey, A. D. Osterhaus, D. D. Erdman, and L. J. Anderson. 2002. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect. Dis* 185:1660-1663.

Pilger, D. A., V. V. Cantarelli, S. L. Amantea, and S. Leistner-Segal. 2011. Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 106:56-60.

Poch, O., I. Sauvaget, M. Delarue, and N. Tordo. 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* 8:3867-3874.

Raza, K., S. B. Ismailjee, M. Crespo, S. M. Studer, S. Sanghavi, D. L. Paterson, E. J. Kwak, C. R. Rinaldo, Jr., J. M. Pilewski, K. R. McCurry, and S. Husain. 2007. Successful outcome of human metapneumovirus (hMPV) pneumonia in a lung transplant recipient treated with intravenous ribavirin. *J Heart Lung Transplant.* 26:862-864.

Ruiz-Arguello, M. B., D. Martin, S. A. Wharton, L. J. Calder, S. R. Martin, O. Cano, M. Calero, B. Garcia-Barreno, J. J. Skehel, and J. A. Melero. 2004. Thermostability of the human respiratory syncytial virus fusion protein before and after activation: implications for the membrane-fusion mechanism. *J Gen Virol* 85:3677-3687.

Russell, R., R. G. Paterson, and R. A. Lamb. 1994. Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein. *Virology* 199:160-168.

Ryder, A. B., S. J. Tollefson, A. B. Podsiad, J. E. Johnson, and J. V. Williams. 2010. Soluble recombinant human metapneumovirus G protein is immunogenic but not protective. *Vaccine* 28:4145-4152.

Sastre, P., J. A. Melero, B. Garcia-Barreno, and C. Palomo. 2004. Comparison of antibodies directed against human respiratory syncytial virus antigens present in two commercial preparations of human immunoglobulins with different neutralizing activities. *Vaccine* 23:435-443.

Sastre, P., J. A. Melero, B. Garcia-Barreno, and C. Palomo. 2005. Comparison of affinity chromatography and adsorption to vaccinia virus recombinant infected cells for depletion of antibodies directed against respiratory syncytial virus glycoproteins present in a human immunoglobulin preparation. *J Med Virol* 76:248-255.

Schowalter, R. M., S. E. Smith, and R. E. Dutch. 2006. Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH. *J Virol* 80:10931-10941.

Schuster, J. E., R. G. Cox, A. K. Hastings, K. L. Boyd, J. Wadia, Z. Chen, D. R. Burton, R. A. Williamson, and J. V. Williams. 2014. A Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibody Exhibits In Vivo Efficacy Against Both Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus. *J. Infect. Dis.*

Shirogane, Y., M. Takeda, M. Iwasaki, N. Ishiguro, H. Takeuchi, Y. Nakatsu, M. Tahara, H. Kikuta, and Y. Yanagi. 2008. Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J Virol* 82:8942-8946.

Singleton, R., L. Dooley, D. Bruden, S. Raelson, and J. C. Butler. 2003. Impact of palivizumab prophylaxis on respiratory syncytial virus hospitalizations in high risk Alaska Native infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 22:540-545.

Skehel, J. J., P. M. Bayley, E. B. Brown, S. R. Martin, M. D. Waterfield, J. M. White, I. A. Wilson, and D. C. Wiley. 1982. Changes in the conformation of influenza virus

hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* 79:968-972.

Skiadopoulos, M. H., S. Biacchesi, U. J. Buchholz, E. Amaro-Carambot, S. R. Surman, P. L. Collins, and B. R. Murphy. 2006. Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *Virology* 345:492-501.

Skiadopoulos, M. H., S. Biacchesi, U. J. Buchholz, J. M. Riggs, S. R. Surman, E. Amaro-Carambot, J. M. McAuliffe, W. R. Elkins, M. St Claire, P. L. Collins, and B. R. Murphy. 2004. The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. *J Virol* 78:6927-6937.

Swanson, K., X. Wen, G. P. Leser, R. G. Paterson, R. A. Lamb, and T. S. Jardetzky. 2010. Structure of the Newcastle disease virus F protein in the post-fusion conformation. *Virology* 402:372-379.

Swanson, K. A., K. Balabanis, Y. Xie, Y. Aggarwal, C. Palomo, V. Mas, C. Metrick, H. Yang, C. A. Shaw, J. A. Melerio, P. R. Dormitzer, and A. Carfi. 2014. A monomeric uncleaved respiratory syncytial virus F antigen retains prefusion-specific neutralizing epitopes. *J. Virol.* 88:11802-11810.

Tang, R. S., K. Mahmood, M. MacPhail, J. M. Guzzetta, A. A. Haller, H. Liu, J. Kaur, H. A. Lawlor, E. A. Stillman, J. H. Schickli, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, and R. R. Spaete. 2005a. A host-range restricted parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the human metapneumovirus (hMPV) fusion protein elicits protective immunity in African green monkeys. *Vaccine* 23:1657-1667.

Tang, R. S., K. Mahmood, M. MacPhail, J. M. Guzzetta, A. A. Haller, H. Liu, J. Kaur, H. A. Lawlor, E. A. Stillman, J. H. Schickli, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, and R. R. Spaete. 2005b. A host-range restricted parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the human metapneumovirus (hMPV) fusion protein elicits protective immunity in African green monkeys. *Vaccine* 23:1657-1667.

Tayyari, F., D. Marchant, T. J. Moraes, W. Duan, P. Mastrangelo, and R. G. Hegele. 2011. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat. Med.* 17:1132-1135.

Techarpornkul, S., N. Barretto, and M. E. Peeples. 2001. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J Virol* 75:6825-6834.

Techarpornkul, S., P. L. Collins, and M. E. Peeples. 2002. Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus. *Virology* 294:296-304.

Teng, M. N. and P. L. Collins. 1998. Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J Virol* 72:5707-5716.

Teng, M. N., S. S. Whitehead, and P. L. Collins. 2001. Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. *Virology* 289:283-296.

Thammawat, S., T. A. Sadlon, P. G. Hallsworth, and D. L. Gordon. 2008. Role of cellular glycosaminoglycans and charged regions of viral G protein in human metapneumovirus infection. *J Virol* 82:11767-11774.

Ulbrandt, N. D., H. Ji, N. K. Patel, A. S. Barnes, S. Wilson, P. A. Kiener, J. Suzich, and M. P. McCarthy. 2008. Identification of antibody neutralization epitopes on the fusion protein of human metapneumovirus. *J Gen Virol* 89:3113-3118.

Ulbrandt, N. D., H. Ji, N. K. Patel, J. M. Riggs, Y. A. Brewah, S. Ready, N. E. Donacki, K. Folliot, A. S. Barnes, K. Senthil, S. Wilson, M. Chen, L. Clarke, M. MacPhail, J. Li, R. M. Woods, K. Coelingh, J. L. Reed, M. P. McCarthy, D. S. Pfarr, A. D. Osterhaus, R. A. Fouchier, P. A. Kiener, and J. A. Suzich. 2006. Isolation and characterization of monoclonal antibodies which neutralize human metapneumovirus in vitro and in vivo. *J Virol* 80:7799-7806.

van den Hoogen, B. G., T. M. Bestebroer, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier. 2002. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* 295:119-132.

van den Hoogen, B. G., J. C. de Jong, J. Groen, T. Kuiken, R. de Groot, R. A. Fouchier, and A. D. Osterhaus. 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med* 7:719-724.

van den Hoogen, B. G., S. Herfst, L. Sprong, P. A. Cane, E. Forleo-Neto, R. L. de Swart, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier. 2004. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg. Infect. Dis* 10:658-666.

Ver, L. S. Caracterización estructural y funcional de la proteína de fusión del metaneumovirus humano. Tesis Doctoral 2008

Vey, M., W. Schafer, S. Berghofer, H. D. Klenk, and W. Garten. 1994. Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J. Cell Biol.* 127:1829-1842.

Walsh, E. E. and J. Hruska. 1983. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J. Virol.* 47:171-177.

Wen, X., J. C. Krause, G. P. Leser, R. G. Cox, R. A. Lamb, J. V. Williams, J. E. Crowe, Jr., and T. S. Jardetzky. 2012. Structure of the human metapneumovirus fusion protein with neutralizing antibody identifies a pneumovirus antigenic site. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19:461-463.

Williams, J. V., Z. Chen, G. Cseke, D. W. Wright, C. J. Keefer, S. J. Tollefson, A. Hessel, A. Podsiad, B. E. Shepherd, P. P. Sanna, D. R. Burton, J. E. Crowe, Jr., and R. A. Williamson. 2007. A recombinant human monoclonal antibody to human metapneumovirus fusion protein that neutralizes virus in vitro and is effective therapeutically in vivo. *J Virol* 81:8315-8324.

Williams, J. V., J. E. Crowe, Jr., R. Enriquez, P. Minton, R. S. Peebles, Jr., R. G. Hamilton, S. Higgins, M. Griffin, and T. V. Hartert. 2005a. Human metapneumovirus infection plays an etiologic role in acute asthma exacerbations requiring hospitalization in adults. *J Infect. Dis* 192:1149-1153.

Williams, J. V., R. Martino, N. Rabella, M. Otegui, R. Parody, J. M. Heck, and J. E. Crowe, Jr. 2005b. A prospective study comparing human metapneumovirus with other respiratory viruses in adults with hematologic malignancies and respiratory tract infections. *J. Infect. Dis.* 192:1061-1065.

Williams, J. V., S. J. Tollefson, S. Nair, and T. Chonmaitree. 2006. Association of human metapneumovirus with acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 70:1189-1193.

Wyde, P. R., S. N. Chetty, A. M. Jewell, G. Boivin, and P. A. Piedra. 2003. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res.* 60:51-59.

Yin, H. S., R. G. Paterson, X. Wen, R. A. Lamb, and T. S. Jardetzky. 2005. Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* 102:9288-9293.

Yin, H. S., X. Wen, R. G. Paterson, R. A. Lamb, and T. S. Jardetzky. 2006. Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature* 439:38-44.

Zhao, X., M. Singh, V. N. Malashkevich, and P. S. Kim. 2000. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* 97:14172-14177.

Zimmer, G., K. K. Conzelmann, and G. Herrler. 2002. Cleavage at the furin consensus sequence RAR/KR(109) and presence of the intervening peptide of the respiratory syncytial virus fusion protein are dispensable for virus replication in cell culture. *J Virol* 76:9218-9224.

Ver, L. S. Caracterización estructural y funcional de la proteína de fusión del metaneumovirus humano. Tesis Doctoral 2008

